

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Jaanika Moro

Une- ja ärkveloleku tsükli analüüs TÜ Eesti Geenivaramu doonoritel
***Per3* geeni varieeruva arvuga tandemkorduse rs57875989 mõju**
uneparameetritele

Bakalaureusetöö

Juhendajad: Maris Teder-Laving, MSc

Prof. Andres Metspalu, M.D., PhD

TARTU 2013

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID JA TERMINID	4
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Tsirkadiaansed rütmid.....	7
1.2. Endogeenne tsirkadiaanne kell ja SCN.....	7
1.2.1. <i>Zeitgeberi</i> signaalid	10
1.2.2. <i>Zeitgeberi</i> signaalide seos melatoniini ja kortisooliga	10
1.2.2.1. Melatoniini seos kehatemperatuuriga.....	12
1.3. Tsirkadiaanne tüpoloogia.....	13
1.3.1. Kronotüübi hindamiseks kasutatavad küsimustikud	13
1.3.2. Erinevate kronotüüpidega inimeste jaotus populatsioonis	15
1.3.2.1. Varajane ja hiline kronotüüp	15
1.3.3. Kronotüübi sõltuvust vanusest ja soost	17
1.3.4. Kronotüüp ja metabooloomika	19
1.4. Tsirkadiaanse kella molekulaarne mehhanism	20
1.4.1. <i>Period</i> geeniperekond.....	22
1.4.1.1. <i>Per3</i> asukoht ja funktsioon genoomis	22
1.4.1.2. <i>Per3</i> lühike ja pikk VNTR	22
1.4.1.3. <i>Per3</i> VNTR mõju tsirkadiaansetele rütmidele ja haigustele.....	23
2. EKSPERIMENTAALOSA	26
2.1. Töö eesmärgid.....	26
2.2. Materjal ja metoodika	26
2.2.1. Valim	26
2.2.2. Uneparameetrite arvutamine.....	26
2.2.3. Genotüüpiseerimine.....	27
2.3. Tulemused ja arutelu.....	28
2.3.1. Uneparameetrid koguvalimis.....	28
2.3.2. <i>Per3</i> VNTR polümorfismi mõju kronotüübile	32
KOKKUVÕTE	38
SUMMARY	40
TÄNUSÕNAD	42
KIRJANDUSE LOETELU.....	43
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	49
LISAD	50
Lisa 1.	50

Lisa 2.	52
Lisa 3.	53
Lisa 4.	54
Lisa 5..	55
Lisa 6.	56
Lisa 7.	57
LIHTLITSENTS.....	58

KASUTATUD LÜHENDID JA TERMINID

AMPK	<i>Adenosine monophosphate kinase</i> , adenosiin monofosfaat kinaas
ap	Aluspaar, <i>base pair (bp)</i>
ASPS	<i>Advanced sleep phase syndrome</i> , varajase une sündroom
AvSD	<i>Average sleep duration</i> , keskmine une kestus
<i>Bmal1</i>	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (Arntl)</i> , heeliks-ling-heeliks-PAS transkripsioonifaktorit kodeeriv geen, mis mõjutab tsirkadiaanseid rütme
CCG	<i>Clock-controlled genes</i> , tsentraalsete kellageenide poolt kontrollitud geenid
CK1	<i>Casein kinase1</i> , kaseiini kinaas 1
<i>Clock</i>	<i>Circadian Locomotor Output Cycles Kaput</i> , heeliks-ling-heeliks-PAS transkripsioonifaktorit kodeeriv geen, mis mõjutab tsirkadiaanseid rütme
<i>Cry</i>	<i>Cryptochrome gene</i> , krüptokroomi valku kodeeriv geen
CT	<i>Circadian typology</i> , tsirkadiaanne tüpoloogia
DSPS	<i>Delayed sleep phase syndrome</i> , hilinenud une sündroom
ET	<i>Evening type</i> , hiline kronotüüp ehk „ööküll“
FBXL3	<i>F-box/LRR-repeat protein 3</i> , valk, mida inimestel kodeerib <i>FBXL3</i> geen
KMI	Kehamassiindeks
Lx	Valgustatuse ühik SI-süsteemis. Pinna valgustatus on 1 lx, kui pinna 1 ruutmeetrile langeb valgusvoog 1 lumen.
MCTQ	<i>The Munich ChronoType Questionnaire</i> , Müncheni kronotüübi küsimustik
MEQ	<i>Morningness-Eveningness Questionnaire</i> , Horne ja Östbergi poolt väljatöötatud küsimustik hommik-õhtu aktiivsuse eelistuse hindamiseks
MSF	<i>Mid-sleep on free days</i> , une keskaeg vabadel päevadel
MSFsasc	<i>Mid-sleep on free days, sleep, age and sex corrected</i> , unevõla, vanuse ja soo suhtes korrigeeritud une keskaeg vabadel päevadel
MSFsc	<i>Mid-sleep on free days, sleep corrected</i> , unevõla suhtes korrigeeritud une keskaeg vabadel päevadel
MSW	<i>Mid-sleep on workdays</i> , une keskaeg tööpäevadel
MT	<i>Morning type</i> , varajane kronotüüp ehk „lõoke“
NT	<i>Neither type</i> , keskmine kronotüüp
<i>Per</i>	<i>Period gene</i> , period valku kodeeriv geen
PSQI	<i>Pittsburgh Sleep Quality Index</i> , Pittsburghi une kvaliteedi indeks
SCF	<i>Skp1-Cullin-F-box protein complex</i> , valkude kompleks ubikvitineeritava märklauaga interakteerumiseks
SCN	<i>Suprachiasmatic nucleus</i> , suprakiasmaatiline tuum
SD _f	<i>Sleep duration on free days</i> , une kestus vabadel päevadel
SD _w	<i>Sleep duration on workdays</i> , une kestus tööpäevadel
SE _f	<i>Wake up time on free days</i> , ärkamise aeg vabadel päevadel
SO _f	<i>Sleep onset on free days</i> , une algusaeg vabadel päevadel
VNTR	<i>Variable number tandem repeat</i> , varieeruva arvuga tandemkordus
ΔMS	<i>Social jetlag</i> , „sotsiaalne“ võõndivahetusväsimus

β -TrCP *F-box/WD repeat-containing protein 1A* (FBXW1A) ehk Fbxw1, valk, mida inimestel kodeerib BTRC (*beta-transducin repeat containing*) geen

SISSEJUHATUS

Meie igapäevast elu organiseerivad kolm erinevat kella. Päikese kell varustab meid päeval ajal valgusega ja määrab välistemperatuuri. Sotsiaalse kellaga puutume kokku igapäevaseid kohustusi täide viies. Bioloogilist kella tunnetame kõige enam olukordades, mis võivad tekitada unepuudust, näiteks vahetustega töötades, iga-aastasel üleminekul suveajale (Roenneberg jt., 2003).

Päike, sotsiaalne kell ja individuaalne sisemine kell – kõik need süsteemid peavad omavahel vastastikku koos toimima. Neist olulisim on meie ööpäevane endogeenne kell, mis hoiab meid ärkvel keskmiselt 16 tundi. Peale ärkvelolekut hakkame kaotama kontrolli oma liigutuste ja mõtete üle ning uinume. Sellised ööpäevased muutused on nii loomulikud, et bioloogilised mehhanismid, mis on nende kõige aluseks, olid sajandeid uurimata. Nüüdseks on teada, et ööpäevaseid rütme kontrollib meie endogeenne kell, mis on sünkroonis planeedi 24-tunnise ööpäevaga. Une ja ärkveloleku faaside vaheldumine peegeldab meie kehas alatasta toimuvaid muutusi, geenide sisse- ja väljalülitumist ning sellest tulenevaid biomolekulide kontsentratsiooni tsüklilisi muutusi kudedes (Roenneberg, 2012).

Käesoleva töö eesmärgiks oli Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu doonorite andmete põhjal uurida eestlaste populatsioonis indiviidide une kestuse ja hommik-õhtu eelistuse erinevusi ning geeni *Per3* varieeruva arvuga tandemkorduse (rs57875989) kui endogeense teguri võimalikku mõju ööpäevase aktiivsuspäriodi kujunemisele.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Tsirkadiaansed rütmid

Organismidele iseloomulikud bioloogilised rütmid ja nende ajaline organisatsioon on oma olemuselt adaptatiivne nähtus, mis on tekkinud vastuseks perioodiliselt muutuvatele keskkonnasignaalidele. Viimased on omakorda põhjustatud Maa pöörlemisest ümber oma telje ja tiirlemisest ümber Päikese (Reinberg ja Ashkenazi, 2003).

Antud bakalaureusetöö keskendub täpsemalt tsirkadiaansetele rütmidele, eelkõige une ning ärkveloleku perioodilisusele. Tsirkadiaansed (*circa diem*) rütmid on eluslooduses üldlevinud bioloogilised rütmid, mis korduvad sarnaselt öö ja päeva vaheldumise rütmile iga 24 tunni järel. See tähendab, et teatud parameetrid, nt hormoonide tase veres või aktiivsus, varieeruvad kellaajaliselt. Tsirkadiaansed rütmid on üpris täpselt ajastatud ja püsivad ka tingimustes, kus puuduvad välised mõjurid („vabajooksu“ periood on 24 tundi) ehk on endogeensed. Samas aga kohanevad rütmid väliskeskkonna tingimuste muutustega, enim valguse intensiivsuse muutusega ning vähem välistemperatuuri muutusega. Viimane peegeldab tsirkadiaansetele rütmidele omast temperatuurikompensatsiooni, mis tähendab, et „vabajooksu“ perioodi kestus ei sõltu välistemperatuurist (Vitaterna jt., 2001; Roenneberg ja Mellow, 2005)

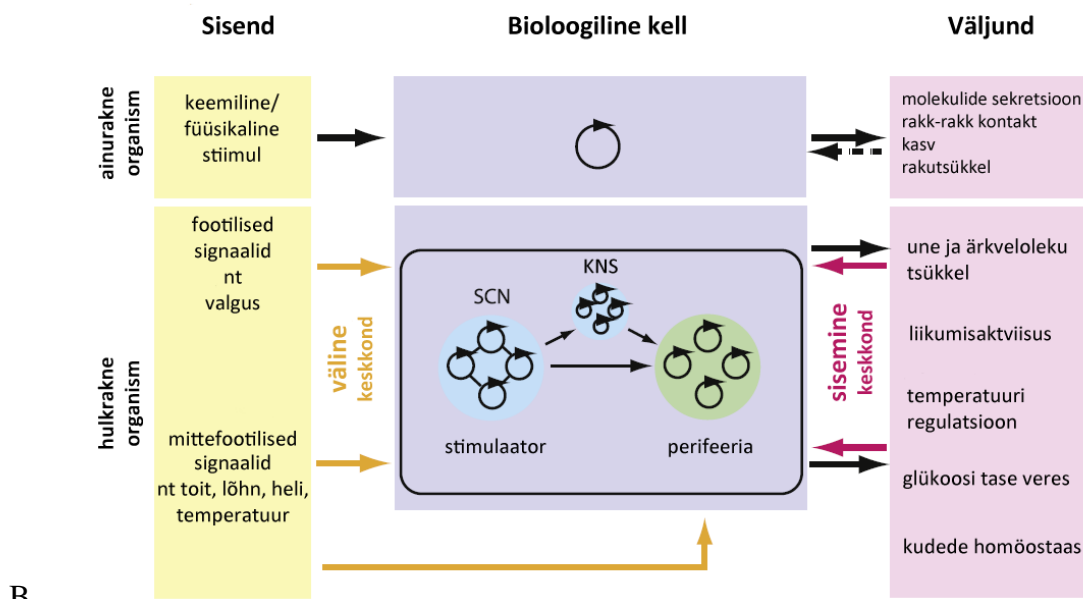
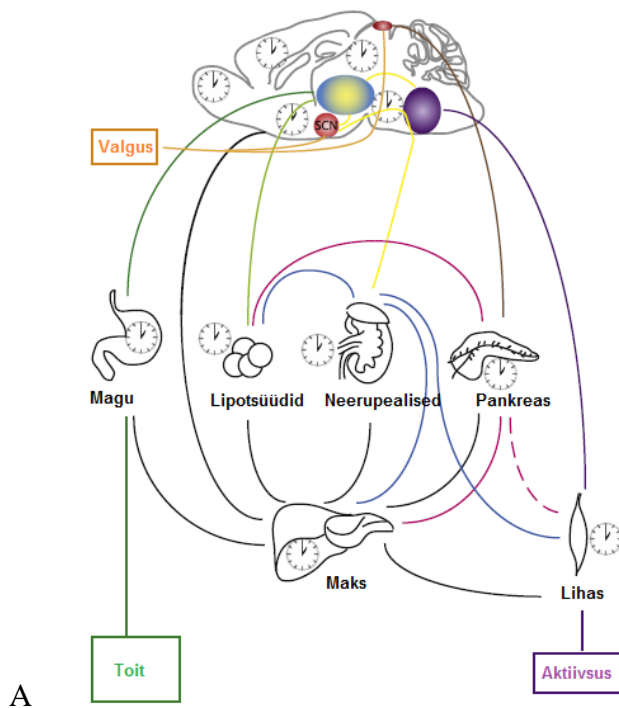
Tsirkadiaanseid rütme iseloomustades kasutatakse järgmisi parameetreid: perioodi pikkus τ (~ 24 h), akrofaas ehk rütmi maksimumväärtus, amplituud ja keskvärtus. Rütme, mis järgivad koosinuskurvi, saab kirjeldada kõiki nelja karakteristikut kasutades, teised on enamasti iseloomustatud keskvärtuse ja perioodi abil. Lisaks on tsirkadiaansetel rütmidel tugev geneetiline tagapõhi ning neid kontrollivad bioloogilised kellad, mis on sünkroonis keskkonnasignaalidega, mille τ on samuti ~ 24 h (Reinberg ja Ashkenazi, 2003).

1.2. Endogeenne tsirkadiaanne kell ja SCN

Endogeenne tsirkadiaanne kell esineb kõikide loomade, seente, taimede ja tsüanobakterite esindajatel ning funktsioneerib ööpäevaseid rütme tekitades (Nadkarni jt., 2005; Roenneberg jt., 2007a). Imetajate tsirkadiaanne kellasüsteem koosneb ostsillaatorite hierarhiast, mis funktsioneerib rakulisel, koelisel ja süsteemsel tasandil. Kogu süsteemi juhib nn tsentraalne kellakeskus, mis asub ajus optilise kiasmi (nägemisnärvide ristumiskoht) kohal olevas hüpotaalamuse suprakiasmaatilises tuumas ehk SCN-s ja koosneb $\sim 20\,000$ neuronist, mis moodustavad omavahel paare. SCN reguleerib aktiivsus- ja puhkeperioodide

vaheldumist, toitumist, kehatemperatuuri ja hormoonide taseme muutusi (Schibler ja Sassone-Corsi, 2002; Mohawk jt., 2012; Liu ja Chu, 2013). Lisaks põhilisele kellakeskusele SCN-s, paiknevad kellad ka väljaspool aju, organismi perifeersetes organites. Perifeerseid kellasid on peaaegu sama palju, kui on organismis rakke. Tsirkadiaansete rütmide esinemist on näidatud isegi kultiveeritud rakkudes (Schibler ja Sassone-Corsi, 2002).

SCN-i põhifunktsiooniks on kõigi organismis esinevate individuaalsete kellade omavaheline kooskõlastamine ja ööpäeva 24-tunnise perioodiga sünkroonis hoidmine (Joonis 1, Albrecht, 2012). SCN neuronid, nagu ka teised rakud, suudavad tekitada autonoomseid tsirkadiaanseid rütme, kuid sealsed närvirakud on mitmes mõttes erilised (Welsh jt., 2004; Welsh jt., 2010). Esiteks võtavad nad silma võrkkesta ja hüpotaalamuse vahelise ühenduse kaudu vastu reetinast tulevaid valgussignaale ja muundavad need „ajaliseks“ informatsiooniks, mis määrab elektriliste, endokriinsete ja metaboolsete signaaliülekanne radade kaudu terve organismi ööpäevase rütmi (Schibler ja Sassone-Corsi, 2002; Albrecht, 2012). Seejärel on oluline SCN neuronitele iseloomulik omavaheline kommunikatsioon, mille abil saavutatakse olukord, kus SCN neuronid omandavad identse tsirkadiaanse rütmi. Tänu sellele toimub sünkronisatsioon isegi konstantses pimeduses (Aton ja Herzog, 2005). Viimaks on nad otseste (tsükliline hormoonide/valkude sekretsioon ja närviimpulsside ülekanne perifeeriasse) ja kaudsete (ööpäevase aktiivsuse- ja puhkeperioodi vaheldumise kontroll) signaaliülekannete abil võimelised sünkroniseerima ka teisi rakke (Schibler ja Sassone-Corsi, 2002).



Joonis 1. Imetajate tsirkadiaanse süsteemi organisatsioon.

A. Tsirkadiaansed kellad esinevad erinevate organite kõigis rakkudes. SCN (punane ring) sünkroniseerib teiste organite keskseid kellasid, mis on seotud metaboolsete interaktsioonidega (sinise- ja kollasevärviline ovaal) ning aktiivsusega (lilla ovaal). Sünkroniseerimine toimub otseseid ja kaudseid radasid mööda (kollased jooned). Nii SCN kui ka käbikheha (punane ovaal) on valguse suhtes tundlikud (oranžid jooned). Hormonaalsed signaaliülekanne rajad erinevate organite vahel: melatoniin (pruun joon), greliin (tumeroheline joon), leptiin (heleroheline joon), insuliin ja glükagoon (roosa joon, punktirjoon tähistab ainult insuliini) ning adrenaliin (sinine joon). Must joon näitab metabolismi radasid: karbohüdraadid, rasvhapped ja aminohapped. Neuronite vahelisi ühendusi peaaegu ja seljaaju ja lihaste vahel tähistab lilla joon.

B. Tsirkadiaanse süsteemi liigendus: sisend, kellamehhanism ja väljund. Selline alajaotus eksisteerib nii rakulisel kui ka süsteemsel tasandil (Albrecht, 2012, kohandatud).

Tsentraalse kellakeskuse ja perifeersetes kudedes paiknevate kellade vastastikuse toime mehhanism ei ole praeguseni täielikult lahti seletatud. Nende interaktsioonide väljaselgitamine aitaks paremini mõista neuroloogilise ja metaboolse homöostaasi saavutamist une ja ärkveloleku tsükli jooksul, mis omakorda oleks abiks paljude kehakaalu ja neuropsühhiaatriliste probleemide ärahoidmisel. On teada, et viimaste üheks tekkepõhjuseks on tsirkadiaanse süsteemi desünkroniseerumine, mis võib tuleneda tsentraalse ja perifeersete kellade vahelistest signaaliülekannete häiretest (Albrecht, 2012).

1.2.1. *Zeitgeberi* signaalid

Kui kõrvaldada päikesevalgusest tulenev ja sotsiaalne mõju, siis bioloogiline kell „jookseb vabalt“, perioodi pikkusega ~ 24 tundi (23,47–24,64 tundi, Wyatt jt., 1999). Reaalses elus mõjutavad endogeenset bioloogilist kella mitmed välised *zeitgeberi* (saksa keeles 'sünkroniseerija' – termin, mille võttis kasutusele üks kronobioloogia rajajatest, sakslane J. Aschoff¹) signaalid, mis sünkroniseerivad organismi endogeenseid rütme Maa 24-tunnise päeva ja öö vaheldumise tsükliga ning 12 kuu tsükliga (Roenneberg jt., 2007a; Toh, 2008). Kõige tugevam *zeitgeber* on valgus, mis muudetakse silmapõhjas retinaalseteks signaalideks ja need omakorda viiakse läbi nägemisnärvide SCN-i, kus määratakse 24-tunnine rütm. Erinevalt teistest organismidest on imetajatel teadaolevalt ainsateks fotoretseptiivseteks elunditeks silmad. Valgusele kui *zeitgeberile* reageerivad silma võrkkestas olevad kolvikased ja kepikased ning fotopigment melanopsiini sisaldavad fotosensitiivsed ganglionid (Foster ja Hankins, 2007; Roenneberg jt. 2007a). Lisaks valgusele, mõjuvad *zeitgeberina* veel temperatuur, sotsiaalsed interaktsioonid, ravimite manustamine, füüsiline aktiivsus ja toitumisharjumused. Vastuseks *zeitgeberi* signaalidele toimuvad muutused organismi molekulaarsel tasandil, mille tulemusel viiakse endogeenne ja eksogeenne kell omavahel sünkrooni (Toh, 2008).

1.2.2. *Zeitgeberi* signaalide seos melatoniini ja kortisooliga

Inimese ööpäevarütmi saab hästi jälgida hormoon melatoniini kontsentratsiooni alusel. Hormooni sekretsiooni algus käbikehas justkui ennustaks une algusaega (Arendt, 2006). Melatoniini kontsentratsiooni muutused organismis on valgusest mõjutatud. Nimelt tõuseb melatoniini tase öötundidel ja langeb hommiku saabumisel (Lázár jt., 2013). Endogeense

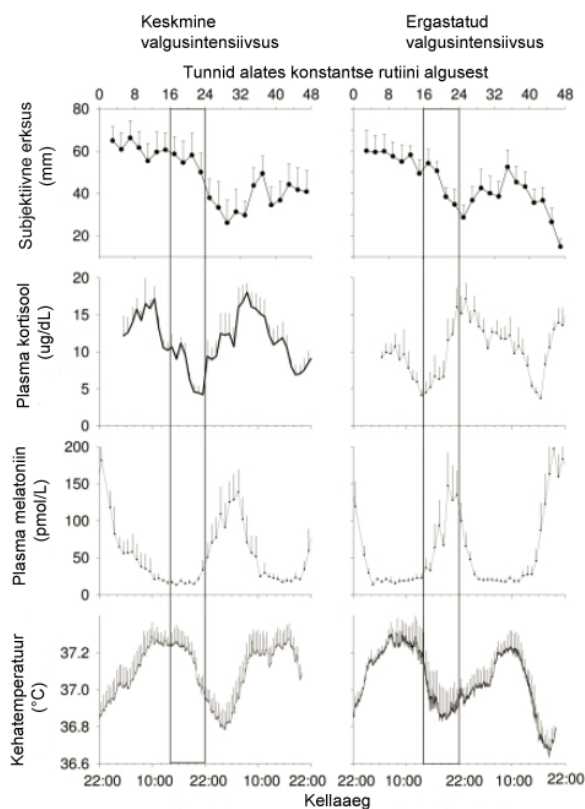
¹ <http://www.iisc.ernet.in/currsci/dec25/articles38.htm>

melatoniini kontsentratsiooni rütmiline kõikumine on üheks paremaks kronobioloogiliseks markeriks eelkõige seetõttu, et hormooni ööpäevast rütmi reguleerib otseselt SCN läbi täpselt defineeritud neuraalse raja. Ka on hormooni kontsentratsiooni mugav määrata vereplasmast, süljest või uriinist (Arendt, 1995; Arendt, 2006).

Kunstliku valguse tõttu ei ole meie une ja ärkveloleku tsükkel enam mõjutatud mitte ainult looduslikust päeva ja öö vahetumise tsüklist. Kunstliku valguse mõju alla sattumist on seostatud töögraafikute ja hilisõhtuse käitumisharjumusega (televiisor, arvutiekraanid jm). Selline eluviis mõjutab tsirkadiaanse füsioloogiat ja põhjustab magamamineku aja hilisemaks muutumist (Santhi jt., 2012), sest õhtusel ja öisel ajal pärsib valgus (eelkõige sinine valgus) melatoniini sekretsiooni, kasutades selleks tsirkadiaanse fotoretseptiooni teid (Arendt, 2006). Inglismaal Surrey Ülikooli Unekeskuses läbiviidud laboratoorses uneuuringus, mis hõlmas 35 mitesuitsetavat tervet indiviidi (20–32 a), leiti, et hilisem melatoniini kontsentratsiooni tõusu algusaeg korreleerub une alguse ja püsiva unefaasi saabumise edasilükkumisega ($r = 0,39$, $p = 0,024$) ning ka insomnia indeksiga ($r = 0,47$, $p = 0,004$) (Lázár jt., 2013).

Neerupealiste koores sünteesitava kortisooli tsirkadiaanne rütm on melatoniini rütmiga vastasfaasis. Kortisooli tase langeb öösel madalale ja tõuseb hommikul kiirelt, soodustades ärkamisprotsessi². Ka kortisooli kontsentratsioon on valgusest mõjutatud. Noortel unehäireteta meestel nn konstantse rutiini (eksperimentaalne protokoll, kus valgus, temperatuur ja aktiivsus hoitakse püsival režiimil, et hinnata endogeense tsirkadiaanse rütmi karakteristikuid, Duffy ja Dijk, 2002) tingimustes läbiviidud uuring näitas, et plasma kortisooli taseme miinimum langeb kokku magamamineku ajaga ning maksimum saabub vahetult enne ärkamist. Uuringus jaotati individid kahte gruppi. Mõlemad grupid viibisid keskmise valgusintensiivsusega ruumis, kuid ühe grupi ruumi ergastati teatud aja tagant ereda valgusega ($\sim 10\,000\text{ lx}$). Ergastatud ruumi individide plasma kortisooli miinimum muutus 5 päeva jooksul keskmiselt 9 tundi varasemaks ($p < 0.001$), kuid tavalise valgusega ruumi individide kortisooli rütm ei muutunud oluliselt ($p > 0.2$). Lisaks muutusid ereda valgusega ergastamise tagajärjel ka melatoniini ja kehatemperatuuri rütmid varasemaks. Mainitu põhjustas omakorda unetsükli varasemaks nihkumise (Joonis 2, Dijk jt., 2012).

² <http://drcatherinedarley.wordpress.com/2009/11/23/your-cortisol-rhythm-and-sleep/>



Joonis 2. **Tsirkadiaansete markerite ööpäevased muutused valgusintensiivsusega ruumides viibijatel.** Kehatemperatuuri, melatoniini, kortisooli ja erksuse ajastus konstantse rutiini tingimustes indiviididel, kes olid keskmise valgusintensiivsusega ruumis ja indiviididel, kelle ruumi ergastati teatud aja tagant ereda valgusega. Erksuse andmed üldistati kahetunniste vahedega. Graafikuid läbiv kast tähistab eelmise päeva une aega. Graafikutel on keskväärtnus andmetest \pm standardviga (Dijk jt., 2012, kohandatud).

1.2.2.1. Melatoniini seos kehatemperatuuriga

Enamike organismide jaoks on välistemperatuur väga tugev tsirkadiaansete rütmide sünkronisaator. Imetajatele omab aga välistemperatuuri muutumine üpris nõrka mõju (Refinetti, 2010). Juba pikka aega on teada, et imetajate kehatemperatuuri muutusi juhib SCN koos perifeersete kellade võrgustikuga (Buhr jt., 2010), mõjutades nii hormonaalseid signaaliülekanne radasid (Albrecht, 2012).

Muutused melatoniini tasemes on seotud kehatemperatuuri muutustega ööpäeva jooksul. Erksust, unetust ja une häirumist esineb enim siis, kui kehatemperatuur tõuseb maksimumi, viimane leiab aset aga vahetult enne melatoniini sekretsiooni algust. Ja vastupidi, unetus ja erksus on oma tsirkadiaanses madalseisus, kui kehatemperatuur hakkab jõudma miinimumini või juba on miinimumis, mis omakorda leiab aset peagi pärast melatoniini maksimumi (Wyatt jt., 1999).

1.3. Tsirkadiaanne tüpoloogia

Tsirkadiaanse rütmi ekspressioon erineb indiviiditi ja tuleneb endogeensetest ja eksogeensetest mõjudest. Sellist erinevust võiks käsitleda tsirkadiaanse tüpoloogiana (CT). CT jagab indiviidid üldjoontes kolmeks grupiks: varajane kronotüüp (MT), keskmine kronotüüp (NT) ja hiline kronotüüp (ET) (Adan jt., 2012). Kronotüüp on tunnus, mis iseloomustab inimeste ööpäevast aktiivsuseperioodi³.

CT epidemioloogiat mõjutavad individuaalsed faktorid, näiteks vanus ja sugu, kuid ka keskkond, eelkõige perinataalne fotoperiood ja ekspositsioon päevavalgusele (Adan jt., 2012).

Kuigi epidemioloogilised uuringud on tõestanud keskkonna mõju kronotüübile, on nüüdseks selgunud, et keskkonna ja kronotüübi omavahelised seosed on suures osas tingitud geneetikast. Protsess, mida nimetatakse geen-keskkond interaktsiooniks. Selle tõestuseks on uuringud monosügootsete kaksikutega, mis lubavad geneetika ja keskkonna üksteisest eraldada, et identifitseerida ainult keskkonna mõjusid (Barclay jt., 2013). Üldiselt on leitud, et geneetiline efekt kronotüübile jääb 46,4 ja 52,8 protsendi vahele (95% usaldusintervallid, Koskenvuo jt., 2007).

Kõik ülalolevad faktorid mängivad rolli kogu meie eluea jooksul ja kujundavad kronotüüpi ning seeläbi kaudselt meie iseloomu, toitumist, sõltuvusi, psüühilist seisundit ja muid käitumisharjumusi, sest on selgunud, et ekstreemse kronotüübiga indiviidid võivad erineda viimasena mainitud karakteristikute poolest (Adan jt., 2012).

1.3.1. Kronotüübi hindamiseks kasutatavad küsimustikud

Kõige levinuimaks CT määramise meetodiks on erinevad enesehindamise küsimustikud. Neist siia maani kõige enam kasutatav on MEQ (*Morningness-Eveningness Questionnaire*, Horne ja Östberg, 1976), millele oli 2013. aasta alguse seisuga viidatud üle tuhande korra (Scopus). MEQ koosneb 19 subjektiivsest valikvastustega küsimusest⁴. MEQ informatiivsust katsetati esmalt 150 inimesel vanuses 18–32 eluaastat. Valimis oli naised ja mehed võrdselt. Indiviidid, kes olid MEQ alusel ekstreemsemad kronotüübid, pidasid kolme nädala jooksul unepäevikut. Inimeste reaalse unemustri ja MEQ skoori omavaheline võrdlus andis hea vastavuse. Tulemused näitasid, et MT indiviidid uinuvad 99 minutit ja ärkavad 114 minutit enne ET indiviide. MEQ annab kronotüübi punktisummana (16–86), mis korreleerub indiviidi kehatemperatuuri, melatoniini ja kortisooli rütmidega. Kõrgem punktide arv viitab varasemale

³ <http://www.medilexicon.com/medicaldictionary.php?t=17540>

⁴ <http://www.cet-hosting.com/limesurvey/index.php?sid=61524&lang=en>

ja madalam hilisemale kronotüübile. Järgnevatel aastatel muutus MEQ oma lihtsuse tõttu laialdaselt kasutatavaks kronotüübi hindamise meetodiks (Horne ja Östberg, 1976).

MEQ puuduseks on see, et töö- ja puhkepäevi ei hinnata eraldi. Samuti ei küsita täpset une, aktiivsuse ja päevavalguse käes veedetud aegsid. Mainitu on aga oluline kronotüübi kvantitatiivseks hindamiseks ja edasisteks epidemioloogilisteks analüüsideks (Roenneberg jt., 2007a).

MEQ puudustest ajendatuna koostasid saksa teadlased Till Roennebergi eestvedamisel uue küsimustiku kronotüübi hindamiseks. Loodud MCTQ (*Munich ChronoType Questionnaire*) sisaldab lihtsaid ja otseseid küsimusi une ja aktiivsuse kohta⁵. Kõik küsimused on töö- ja puhkepäevade kohta eraldi esitatud. Selle küsimustiku märkimisväärne korrelatsioon une ja biokeemiliste rütmide (melatoniin ja kortisool) vahel on valideeritud (Roenneberg jt., 2007a). Lisaks viitab MCTQ usaldusväärsusele ka Nováková ja kolleegide avaldatud uuring, kus näidati, et nii melatoniini kontsentratsiooni rütm kui ka geenide *Per1*, *Per2* ja *Rev-erba* ekspressiooni profiilid on korrelatsioonis MCTQ abil saadud kronotüübi hinnanguga (Nováková jt., 2013).

Tuginedes MCTQ-s olevale informatsioonile (täpsed kellaajad töö- ja puhkepäevadel voodisse heitmise, magama jäämise ja ärkamise kohta), saab välja arvutada une kestuse tööpäevadel (SD_w), puhkepäevadel (SD_f) ja keskmise une kestuse (AvSD) ning une keskaja puhkepäevadel (MSF) ja argipäevadel (MSW) (Roenneberg jt., 2007a). Kaks viimast defineerivadki indiviidi kronotüübi (Zavada jt., 2005). Kuna paljudel inimestel koguneb töönädala jooksul unevõlg, mida kompenseeritakse vabadel päevadel, tuleb MSF väärtust une puudujäägi suhtes korrigeerida. Saadakse väärtus MSFsc, mida saab omakorda täpsustada sugu ja vanust neutraliseerides. Viimaseks väärtuseks on MSFsasc, mis määrab kronotüübi kõige täpsemalt. Une keskaegade vahe annab meile hinnangu töönädala jooksul kogunenud une puudujäägi (ΔMS) kohta (Roenneberg jt., 2007a). Täpsed valemid arvutusteks Microsoft Office Excel tarkvaraprogrammis on Lisas 1.

Lisaks eelpoolmainitud küsimustikele, on loodud ka küsimustikke, mis keskenduvad rohkem unepatoloogiate diagnoosimisele. Üheks neist on PSQI (*Pittsburgh Sleep Quality Index*), mis on disainitud spetsiifiliselt une kvaliteedi mõõtmiseks kliinilises populatsioonis. Küsimustik hindab patsiendi und ja selle häirumist ühe kuu jooksul⁶. PSQI seitse erinevat osa annavad individuaalsed skoorid, mis liidetakse omavahel ja saadakse ülemaailmselt kasutatav

⁵ https://www.bioinfo.mpg.de/mctq/core_work_life/core/core.jsp?language=eng

⁶ <http://www.sleep.pitt.edu/includes/showFile.asp?fltype=doc&fIID=2532>

unepatoloogia skoor. Väärtused võivad olla 0 ja 21 vahel. Kõrgem skoor tähendab halvemat und. Tulemused, mis on üle viie, näitavad juba võimalikku unepatoloogiat (Buysse jt., 1989).

1.3.2. Erinevate kronotüüpidega inimeste jaotus populatsioonis

Olenemata oma keerukusest on unel kaks väga selget iseloomustajat, aeg ja pikkus. Kronotüübi hindamisel on olulised karakteristikud samuti une alguse ja lõpu aeg ning une kestus (Allebrandt jt., 2010).

Tuginedes rohkem kui 55 000 inimese täidetud MCTQ küsimustikkude analüüsile, leiti, et kõige sagedasem kronotüüp inimpopulatsioonis uinub (sotsiaalsete kohustusteta) kesköö paiku (täpsemalt 00:09) ning ärkab hommikul kümnekond minutit pärast kaheksat (täpsemalt 8:18). Seega, enim levinud (14,6%) on keskmise kronotüübiga inimesed, kelle keskmine MSF on 04:14. Hilisema kronotüübiga inimesi on 50,4%, kuid varasema kronotüübiga ainult 35%, kellest omakorda ekstreeme on 1% ringis (Roenneberg jt., 2007a).

Peaaegu veerand populatsioonist magab keskmiselt 8 tundi järjest. Umbes 60% vajavad 7,5–8,5 tundi und. Inimesi, kes saavad läbi ainult viie tunniga, on väga vähe, nagu ka neid, kes vajavad rohkem kui kümnet tundi und (Roenneberg, 2012). Keskmise unekestuse arvutamisel on oluline arvestada une kestust töö- ja puhkepäevadel eraldi, sest vabadel päevadel magavad inimesed pikemalt ning selle tulemusel nihkub normaaljaotuse keskpunkt pikema une kestuse suunas (Roenneberg jt., 2007a).

Kõigest eelnevast järeldub, et inimeste jaotus populatsioonis nii kronotüübi kui ka une pikkuse alusel vastab kellukesekujulisele kõverale ehk Gaussi kõverale. Ekstreemselt varajase ja hilise kronotüübiga inimesed ning ekstreemselt lühikese ja pika unega inimesed asuvad vastavalt jaotuse servades ning vahepealse näitajaga inimesed asuvad keskel (Allebrandt ja Roenneberg, 2008). Nii lühikese kui ka pika unega inimeste gruppides on kronotüüpide jaotus samuti sarnane Gaussi kõverale. Kronotüüp ja keskmine une pikkus on iseseisvad ja üksteisest üpris sõltumatud tunnused, kuivõrd MSF-i ja AvSD vahel ei ole leitud märkimisväärset korrelatsiooni (Roenneberg jt., 2007a).

1.3.2.1. Varajane ja hiline kronotüüp

Varajase kronotüübiga inimesed ehk „lõokesed“ ärkavad hommikul vara spontaanselt ja tunnevad ennast erksana. Lisaks on nad õhtul võimelised varakult uinuma. Varajased kronotüübid elavad sünkroonis päikesega ja jõuavad oma aktiivsuse tippu päeva esimesel poolel. Hilise kronotüübiga inimesed ehk „öökullid“ lähevad vastupidiselt hilja voodisse ja

tõusevad sageli üles alles keskpäeval. Neil on raske kohaneda varase ärkamisega, mida võib nõuda töö või mõni muu kohustus. Nad saavutavad oma tegutsemisvalmiduse õhtu saabudes või lausa hilistel tundidel (Schneider jt., 2011).

On loogiline järeldada, et varastel ja hilistel kronotüüpidel on erinevad kortisooli, melatoniini ja kehatemperatuuri rütmide mustrid. „Lõokestel“ on kortisooli kontsentratsioon kehas hommikutundidel kõrgem kui „öökullidel“ ja kuna „lõokesed“ saavutavad hommikul tegutsemisvalmiduse kiiremlt, siis paistab, et kortisool aitab inimestel valmistuda algavaks päevaks (Adan jt., 2012). Melatoniin, olles üheks parimaks une algusaja määrajaks, on samuti „lõokestel“ ja „öökullidel erineval ajal maksimaalses kontsentratsioonis (Arendt jt., 2006). Melatoniini sekretsiooni algusaeg, tipp ja lõppaeg ilmneb MT inimestel 2–3 tundi varem kui ET inimestel ($p < 0,001$). Kehatemperatuuri puhul on MT ja ET indiviididel 2 tunni pikkune faaside erinevus konstantse rutiini tingimustes (Lack jt., 2009).

Mainitud erinevused on veelgi ekstreemsemad patoloogiale lähenevate kronotüübivormide puhul (Jones jt., 1999). ASPS ehk varajase une sündroom on väga harva esinev häire, mida iseloomustab normaalsest 3–4 tundi varasem une alguse ja lõpu aeg (Sack jt., 2007). Lisaks on üheks karakteristikuks lühem τ (nt 23,3 tundi mõõdeti elektroentsefalogrammi kasutades ja melatoniini ning temperatuuri rütmi jälgides, Jones jt., 1999). DSPS ehk hilinenud une sündroom on üpris levinud tsirkadiaanse rütmi häire, mida iseloomustab võimetus soovitud ajal magama jääda, mistõttu une keskaeg saabub alles varahommikul kella kolme ja kuue vahel ning ärkamine lükkub sellevõrra edasi (Sack jt., 2007). Ka DSPS haiguse puhul muutub τ periood, kuid keskmisest pikemaks (nt 25,38 tundi, Campell ja Murphy, 2007).

ET ja MT inimestel on küll erinev une ajastus, kuid keskmises une pikkuses puuduvad erilised erinevused (Horne ja Östberg, 1976; Merikanto jt., 2012). Samas, kronotüübi hilisemaks muutumisega lüheneb une kestus tööpäevadel ning pikeneb puhkepäevadel (Roenneberg jt., 2007a). See põhjustab, eelkõige hilistel kronotüüpidel, kroonilist une puudujääki ehk „sotsiaalse“ vööndivahetusväsimuse kuhjumist nädala vältel (Roenneberg jt., 2012). MT indiviididel on seevastu täheldatud väiksemat erinevust töö- ja puhkepäevade magamisharjumuste vahel (Soehner jt., 2011). Paistab, et inimestel, kes magavad vahemikus 23:00 kuni 06:00, on minimaalne või olematu erinevus töö- ja puhkepäevade une kestuses (Roenneberg jt., 2007a). Lisaks korreleerub varasem kronotüüp kindlasti parema une kvaliteedi ja lühema une latentsiga (Soehner jt., 2011).

Hilise kronotüübiga inimestel esineb sagedamini uimastite tarbimist, stressi, unehäireid, depressiooni, sesoonset depressiooni või tähelepanu puudulikkuse häiret (Muro jt., 2009). Lisaks on nad suurema tõenäosusega suitsetajad ja regulaarsed alkoholi tarvitajad kui varajase kronotüübiga inimesed (Wittmann jt., 2012). Noorukieas seostatakse hilist kronotüüpi käitumuslike ja emotsionaalsete probleemidega ning riskialti käitumisega (agressiivsus, raskesti kasvatatavus, harjumuspärane mõnuainete tarvitamine või enesetapumõtted) (Muro jt., 2009). See kõik võib tulla faktist, et ET indiviidide puhul on leitud tugev seos päevase unisuse ja une kvaliteedi languse vahel, mis omakorda mõjutab elukvaliteeti (Schneider jt., 2011).

Isikuomaduste poolest on viimaste uuringute põhjal ET inimesed ekstravertsemad, impulsiivsemad ja seiklushimulisemad, samas kui MT inimesed on pigem introvertsemad, meelekindlamad ja emotsionaalselt stabiilsemad (Muro jt., 2009).

1.3.3. Kronotüübi sõltuvust vanusest ja soost

Iga vanusegrupi puhul on inimeste jaotus kronotüübi järgi sarnane kogu populatsioonis esineva jaotusega, eelpool kirjeldatud Gaussi kõveraga, kuid iga grupi jaotuse keskväärtus varieerub süsteemselt. Lapsed on üldiselt varasemad kronotüübid ja muutuvad arengu käigus üha hilisemateks. Kõige hilisem kronotüüp saavutatakse kahekümnendateks eluaastateks. Peale seda hakkab kronotüüp jälle varasemaks muutuma. Kuna üldise fenomeni järgi saabub naistel küpsus enne mehi, siis mängib lisaks vanusele olulist rolli ka sugu (Roenneberg jt., 2007a). Naiste hilisem kronotüüp ilmneb 19,5 eluaasta juures, samas kui meestel pidurdub kronotüübi hilisemaks muutumine alles 21. eluaastal (Roenneberg jt., 2004).

Kronotüübi muutumise tõttu varajasest hilisesse ja tagasi, on see väga heaks markeriks, märkimaks indiviidid nooruki- ja täiskasvanuea vahelist piiri (Roenneberg jt., 2004). Kui puberteediea lõppu määratakse lihtsalt luude kasvu peatumisega, siis noorukiea lõppu on raske defineerida, sest see on segu füüsilistest, psühholoogilistest, sotsiaalsetest ja vaimsetest muutustest (Park jt., 2002). Üheks noorukiea tunnuseks on võime püsida kaua üleval ja magada hommikul seetõttu pikemalt, kuid umbes 20. eluaastal olukord muutub, sest paljud hormoonid (kasvuhormoon, kortisool), mida keha sünteesib, ja mis samuti und mõjutavad, on vanusest sõltuvad ning nende sekretsioon üleminekuvanasuses muutub. Seega on kronotüübi uuesti varasemaks muutumise algus üheks võimalikuks noorukiea lõpu markeriks (Roenneberg jt., 2004).

Roennebergi uurimisgrupp on saanud valdavalt tulemusi, millest järeldub, et mehed on naistest hilisema kronotüübiga kogu reproduktiivse vältel. Selline erinevus kahe soo vahel kaob 50ndatel, mis langeb kokku keskmise menopausi alguse ajaga (Greer jt., 2003). 60ndatest aastatest läheb kronotüüp üldiselt isegi varasemaks kui see oli lapsepõlves (Roenneberg jt., 2004; Roenneberg jt., 2007a). Tulemusi, kus mehed on hilisema kronotüübiga kui naised, on saanud ka teised ja seda isegi erinevas keskkonnas üles kasvanud monosügootsete kaksikute uurimisel (Barclay jt., 2011; Barclay jt., 2013). Kuid on avaldatud ka vastupidise seosega töid (Park jt., 2002; Merikanto jt., 2012).

Jaapanlased analüüsisid vanuse ja soo mõju une ja ärkveloleku rütmile ning MEQ skoorile. Nende valim koosnes 2252 indiviidist vanuses 6–89 aastat, kes jaotati 21 vanusegrupiks. Leiti samuti, et kronotüüp läheb noortel järjest hilisemaks, kuni teatud vanuseni, ja võtab siis vastupidise suuna. Kuid valimi põhjal tuli ilmsiks, et tööpäevadel oli üle 40 aasta vanustel naistel magamamineku aeg hilisem ja une pikkus märkimisväärselt lühem kui sama vanusegrupi meestel. Lisaks oli keskmine une latents naistel palju suurem kui meestel. Tulemused on seega eelnevate uuringutega vastuolus. See võib olla põhjustatud naiste sotsiaalsetest ja kodustest rollidest Jaapanis (Park jt., 2002).

Soomlaste 25-aastaseid ja vanemaid elanikke hõlmav uuring keskendus küll rohkem kronotüübi ja unega seotud kaebuste omavaheliste seoste väljaselgitamisele, kuid lisaks sellele analüüsiti ka sugu ja vanust. Kronotüüp määrati modifitseeritud MEQ skoori alusel ning leiti, et hiline kronotüüp oli sagedasem just naiste hulgas ja seda peaaegu kõigis vanusegruppides. Meeste hulgas oli ET indiviididel lühem une pikkus kui MT indiviididel, naistel sellist seost ei täheldatud. Võimalik, et sellised tulemused saadi indiviidide värbamisprotsessi tõttu, kuid selle peaks üle kaaluma fakt, et uuringu valim sisaldas indiviide üle terve Soome (Merikanto jt., 2012).

Kõik populatsiooniuuringud ei kinnitagi täiskasvanute puhul seost kronotüübi, soo ja vanuse vahel, ning leiavad, et selline suhe on keerulisem, kui pealtnäha paistab (Paine jt., 2006).

1.3.4. Kronotüüp ja metaboolmika

Paljud uuringud on näidanud, et une kestuse vähenemist saab seostada kehamassiindeksi (KMI) suurenemisega (Bjorvatn jt., 2007). Normaalne KMI jääb vahemikku 18,5–24,9. Kõrgema väärtuse korral on suurenenud oht haigestuda südame- ja veresoonkonna haigustesse, II tüüpi diabeeti ja teatud vähivormidesse⁷.

KMI ja une kestuse vaheliste seoste uurimiseks vastasid 8860 inimest (vanuses 40–45 aastat) uneküsimustikule. Neil mõõdeti pikkus, kehakaal, vererõhk ja määrati verest totaalne kolesterool, HDL kolesterool ja triglütseriidid. Une pikkuse alusel jaotati inividid gruppideks ning nähti kindlat seost lühikese une kestuse ja suurenenud KMI ja seetõttu ka suurenenud ülekaalulisuse vahel (mõlema parameetri jaotus erineva unepikkusega inimeste gruppides oli väga sarnane). Seos oli U-kujuline, see tähendab, et KMI oli suurem inimestel, kes magasid alla kuue tunni või üle üheksa tunni. Veel enam, une pikkusega seostati ka kolesterooli ja triglütseriidide taset veres ning vererõhku. See oli ka esimene selline uuring, mis viimasena mainitud seose välja tõi (Bjorvatn jt., 2007).

Uuem, Roennebergi ja kaaslaste poolt läbiviidud uuring, seostas KMI väärtuse suurenemist une puudujäägiga ehk „sotsiaalse“ võõndivahetusväsimusega (Roenneberg jt., 2012), mis peegeldab kvantitatiivselt meie bioloogilise kella ja sotsiaalse kella erinevustest tulenevat kroonilist unepuudust (Wittmann jt., 2006). Kuna bioloogiline kell reguleerib ka energia homöostaasi (Marcheva jt., 2010), siis võib selle häirumine, mis kaasneb une puudujäägiga, põhjustada kehakaaluga seotud patoloogiaid (Roenneberg jt., 2012). Küsitlusse kaasati 65 000 Kesk-Euroopa inimest, kes täitsid MCTQ. Küsimustiku alusel arvutati lisaks une pikkusele ja kronotüübile ka une puudujääk nädalas (MSW ja MSF vahe). Tulemustest selgus, et vabadel päevadel magavad inimesed, eelkõige noored, tunduvalt kauem kui tööpäevadel ($p < 0,0001$). Seega, on meie uni suuresti mõjutatud sotsiaalsest kellast. Oluline on siin ka une aeg. Olgugi, et oleme võimelised magama väljaspool bioloogilist uneaega, on selline uni palju ebaefektiivsem. Sellest tuleneb ka tõsiasi, et ET inivididel on une puudujääk suurem kui MT inivididel. Reisimisega seotud võõndivahetusväsimus on mööduv nähtus, aga „sotsiaalne“ võõndivahetusväsimus saadab meid üldiselt kogu õpingute ja karjääri vältel, põhjustades une- ja ülekaalulisusega seotud metaboolseid häireid ning langust vaimses võimekuses. Seega on nii une kestus kui ka une aeg olulised KMI määrajad ning pikem uni vähendab pikemas perspektiivis ülekaalulisusega seotud probleeme. Samas

⁷ http://www.nhlbi.nih.gov/health/public/heart/obesity/lose_wt/risk.htm#limitations

aga unepuudus tõstab ülekaaluliseks muutumise tõenäosust ($r = -0,082$, $p < 0,0001$, Roenneberg jt., 2012).

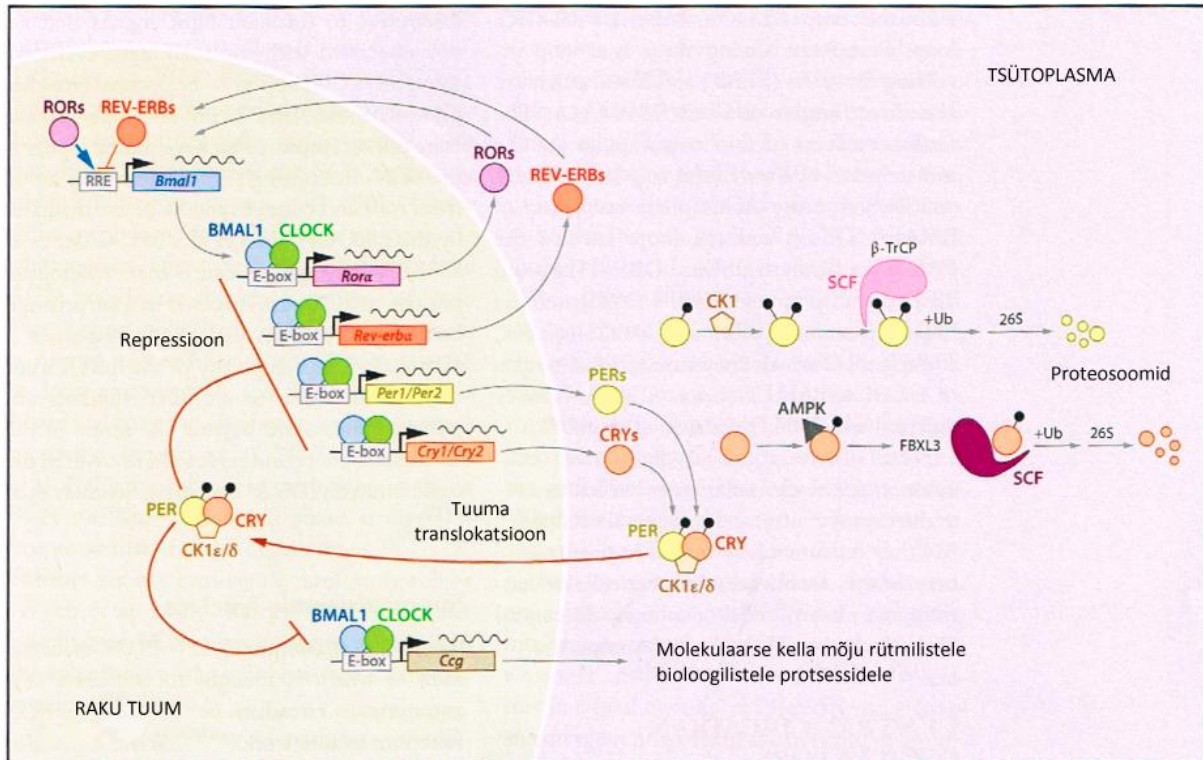
Soomes uuriti kronotüübi seost II tüüpi diabeedi ja südameveresoonkonna haigustega. Leiti, et ET inimestel on 2,5 korda kõrgem risk haigestuda II tüüpi diabeeti ja 1,3 korda kõrgem risk haigestuda arteriaalsesse hüpertooniasse kui MT inimestel (Merikanto jt., 2013). Kõik see sobib kokku Roenneberg jt., töödega, sest on teada, et ET inimesed kannatavad suurema une puudujäägi käes kui MT inimesed (Wittmann jt., 2006). Samuti on soomlaste uuring koosõlas Uus-Meremaa uuringuga, mis tõestas, et ET inimesed kaebavad MT inimestest 2,5 korda tihemini kehva või keskmisest halvema tervise üle ($p < 0,01$, Paine jt., 2006).

Kokkuvõtteks võib bioloogilise kella ignoreerimine (nt äratuskella kasutades, vahetustega töötades) olla üks ülekaalulisuse ja rasvumise epideemia põhjustest. Siinkohal tuleks tähelepanu pöörata suveaja mõjule ja ka näiteks liiga varasele töö- ja koolipäevade algusele (noored on bioloogiliselt hilisema kronotüübiga), mis kõik suurendavad une puudujääki ja seeläbi terviseriske (Roenneberg jt., 2012).

1.4. Tsirkadiaanse kella molekulaarne mehhanism

Imetajate endogeenset ööpäevast kella reguleerivad omavahel funktsionaalselt ühendatud kellageenid (Osland jt., 2011). Imetajate igas rakus olev tsirkadiaanne kell on autonoomne ja iga sellise iseseisva transkriptsioonivõrgustiku regulatsioon põhineb autoregulaatorisel negatiivsel tagasisidel (Takahashi jt., 2008). Kellakeskuse põhikomponentideks on transkriptsiooni aktivaatorid CLOCK (ja selle paraloog NPAS2) ja BMAL1, mille heterodimeerid reguleerivad positiivselt E-elementi (CCG promootoritele iseloomulik järjestus, 5'-CACGTG-3') kaudu *Period* (*Per1*, *Per2* ja *Per3*) ja *Cryptochrome* (*Cry1* ja *Cry2*) geenide transkriptsiooni. *Per* ja *Cry* geeniproduktid akumulereuvad päeva jooksul tsütoplasmas ja teatud kontsentratsiooni saavutamisel dimeriseeruvad ning moodustavad kompleksi koos CK1 ϵ/δ kinaasidega. PER, CRY ja kinaaside kompleks liigub tuuma, kus toimub seostumine CLOCK ja BMAL1 valkudega, misjärel lülitatakse *Per* ja *Cry* transkriptsioon välja (Joonis 3). Selline tagasiside süsteem võtab aega umbes 24 tundi. PER ja CRY valkude fosforüleerituse tase mõjutab valkude stabiilsust ja seeläbi ka tagasiside tsükli kiirust. PER ja CRY valkude tootmise ümberlülitust reguleerib E3 ubikvitiini ligaasi kompleks (Ko ja Takahashi, 2006; Mohawk jt., 2012; Liu ja Chu, 2013).

Lisaks eelnevale, on põhilise CLOCK-BMAL/PER-CRY linguga seotud veel teisigi regulatsiooniradasid. Peamised neist on geenid *Rev-erba* ja *Rora*, mille transkriptsiooni lülitavad samuti sisse CLOCK-BMAL1 heterodimeerid. Mainitud geenide produktid seostuvad peale kindla kontsentratsiooni saavutamist *Bmal1* promootoris esineva D-elemendiga (5'-TTATG(C/T)AA-3', *Rev-erba*-t ja *Rora*-t seostav element ehk RRE), mis repressseerib *Bmal1* geeni transkriptsiooni. Viimasena mainitud ling avaldab vähemal määral mõju ka *Clock* transkriptsioonile (Sato jt., 2004; Mohawk jt., 2012).



Joonis 3. **Tsirkadiaanse kella molekulaarne mehhanism imetajatel.** Keskse tsirkadiaanse kella moodustab autoregulaatorne transkriptsiooniline tagasiside süsteem, mille aktivaatorvalgud CLOCK ja BMAL1 mõjutavad sihtmärkgeene *Per1*, *Per2*, *Cry1* ja *Cry2*. Nende geenide produktid moodustavad negatiivse tagasiside repressorkompleksi. Lisaks sellele tsentraalsele süsteemile, toimib CLOCK-BMAL1 kompleks ka *Rev-erba* ja *Rora* geenidega seotud süsteemile. CLOCK-BMAL1 kompleks reguleerib ka mitmeid allavoolu jäävaid sihtmärkgeene, mida tuntakse kui tsentraalse kella poolt kontrollitavad geenid (CCG). Post-transkriptsioonilisel tasemel on PER ja CRY valkude stabiilsus reguleeritud SCF ja E3 ubikvitiini ligaasi kompleksi abil, mis sisaldab võrdses koguses β -TrCP ja FBXL3 valke. Kinaasid CK1 ϵ/δ ja AMPK fosforüleerivad vastavalt PER ja CRY valgud, mille tulemusel toimub nende valkude E3 ubikvitiini ligaasi kompleksi poliubikvitatsioon ning PER ja CRY valgud degradeeritakse proteosoomides (Mohawk jt., 2012, kohandatud).

Kõik eelpool mainitud molekulaarsete signaalide dünaamilised interaktsioonid tõlgitakse ümber sündmusteks rakkudes, millega kaasnevad membraanipotentsiaali muutused. Potentsiaali muutused kantakse üle neuronitele, mis kontrollivad meie füsioloogilisi protsesse ja need omakorda juhivad meie tsirkadiaanseid rütme (Lee jt., 2010). Seeläbi võivad

polümorfismid geenides, mis on osa molekulaarsest kellamehhanismist, mõjutada ööpäevarütme (Osland jt., 2011). Lisas 2 on välja toodud publikatsioonid, mis on leidnud seose erinevates kellageenides esinevate polümorfismide ja tsirkadiaanse fenotüübi vahel.

1.4.1. *Period* geeniperekond

Period (*Per- Period circadian clock*) geeniperekond reguleerib suprakiasmaatilises tuumas tsirkadiaansete rütmide perioodilisust (Barclay jt., 2011). Inimestel koosneb *Period* geeniperekond kolmest komponendist: *Per1*, *Per2* ja *Per3*, mis paiknevad vastavalt kromosoomides 17⁸, 2⁹ ja 1¹⁰. Kõiki nende geenide poolt toodetud valke fosforüleerib CK1ε, reguleerides nii nende stabiilsust ja translokatsiooni tuumas (Akashi jt., 2002). *Period* geenide hulka kuuluvad geenid reguleerivad iseenda ekspressiooni läbi negatiivse tagasiside süsteemi. *Per* transkriptide ja valkude hulk võngub perioodiliselt ja korreleerub τ perioodiga (Field jt., 2000). Seejuures kõigi kolme geeniprodukti akrofaas saabub ööpäeva eri aegadel. Esmalt hakkab tõusma *Per1*, siis *Per3* ja viimaks *Per2* transkriptsiooni tase (Dunlap, 1999).

1.4.1.1. *Per3* asukoht ja funktsioon genoomis

Per3 on *Period* geeniperekonda kuuluv geen, mida ekspresseeritakse nii SCN-s¹⁰ kui ka perifeerias (Archer jt., 2008). *Per3* asub inimesel esimeses kromosoomis¹⁰ (1p36.23, 7844763–7905237) ja sisaldab 21 eksonit, hõlmates rohkem kui 50 000 aluspaari¹¹. Geeni spetsiifiline funktsioon on ikka veel välja selgitamata¹⁰.

1.4.1.2. *Per3* lühike ja pikk VNTR

Per3 polümorfism rs57875989 (Lázár jt., 2012) on varieeruva arvuga tandemkordus (VNTR), mis asub geeni kodeerivas regioonis, 18. eksonis, ja on spetsiifiline primaatidele (Jenkins jt., 2005).

Tegemist on tandeemse kordusega, mille ühikuks on 54 aluspaari pikkune järjestus, mis esineb geenis kas neli või viis korda (Ebisawa jt., 2001). Nende järjestuste translatsioonil sünteesitakse 18 aminohappe pikkune motiiv, mis eksisteerib *Per3*⁴ ja *Per3*⁵ alleelis vastavalt nelja või viie kordusena (Joonis 4, Archer jt., 2003). Lühemas alleelis on täielikust järjestusest deleteerunud nukleotiidid 7889999–7890052 (referentsjärjestus GRCh37.p10)¹⁰.

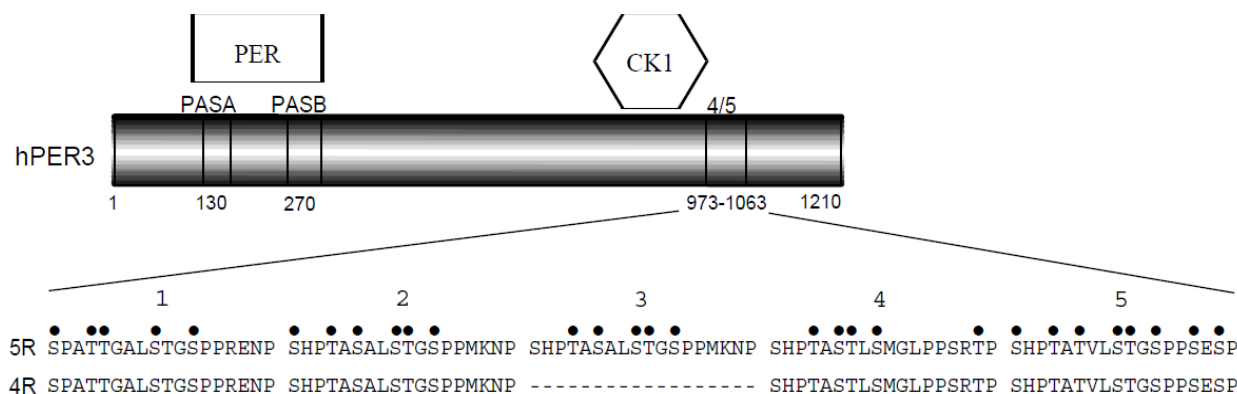
⁸ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5187>

⁹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8864>

¹⁰ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8863>

¹¹ http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000049246;r=1:7844380-7905237;t=ENST00000377532

Lühem alleel esineb enamikes populatsioonides suurema sagedusega kui pikem alleel. *Per3*⁴ alleelisagedused maailmas jäävad 0,191 (Paapua Uus-Guinea) ja 0,822 (Lõuna-Hiina) vahele. Enim levinud sagedused on 0,6–0,7 (Afganistan, Inglismaa, Iraan, Lõuna-Sudaan, Lääne-Aafrika, Nigeeria, Ukraina). Paapua Uus-Guinea erilisus võib tuleneda sealse populatsiooni suurest geneetilisest mitmekesisusest (Nadkarni jt., 2005; Ciarleglio jt., 2008).



Joonis 4. **Inimese PER3 valgu skeem.** Per3 valgu domäänide PASA ja PASB kaudu toimub seostumine teiste PER molekulidega. Järjestuse all, laiendatult, on näha viie ja nelja kordusega regiooni aminohappeline järjestus (5R ja 4R). Kordused on nummerdatud (1–5), ja puuduv kordus *Per3*⁴ alleelis on märgitud punktiirjoonena. CK1ε fosforüleerimise saidi eeldatavad märklaudkohad on tähistatud mustade täppidega. CK1ε konsensusmotiiv on Sp/Tp-X₁₋₃-S/T, kus juhtiv seriin või treoniin fosforüleeritakse ja X tähistab ühte kuni kolme mittespetsiifilist aminohapet (Archer jt., 2003, kohandatud).

Arvatakse, et deletsioon kaotab valgus potentsiaalsed CK1 fosforüleerimissaidid, muutes nii PER3 valgu fosforüleerimisastet (Archer jt., 2003). See omakorda mõjutab valgu post-translatsioonilist modifitseerimist ja stabiilsust ning isegi tertsiaalstruktuuri (Dijk ja Archer, 2010). Kuna on teada, et *Per3* ekspressiooni taseme muutus leukotsüütides korreleerub melatoniini, kortisooli ja une-ärkveloleku rütmiga ning need korrelatsioonid on kummagi alleeli suhtes homosügootsetel indiviididel erinevad, on põhjust oletada, et polümorfism mõjutab tsirkadiaanset rütmi (Archer jt., 2008).

1.4.1.3. *Per3* VNTR mõju tsirkadiaansetele rütmidele ja haigustele

Üks esimestest uuringutest, mis näitas *Per3* VNTR polümorfismi mõju tsirkadiaansele rütmile¹², oli 2001. aastal Jaapanis Ebisawa ja kolleegide poolt läbiviidud töö, kus analüüsiti eelkõige *Per3* seost hilinenud une sündroomiga. DNA-d, mis eraldati DSPS ja ebaregulaarse une-ärkveloleku tsükliga patsientidelt, uuriti *Per3* järjestuse suhtes ning leiti 20 erinevat geenivarianti, millest 13 osutusid SNP-deks. Märgati ka varieeruva arvuga tandemkordust.

¹² http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?LinkName=gene_pubmed&from_uid=8863

Olulisim SNP oli 3110(T→C), mida täheldati ainult *Per3*⁴ alleelis. 48 DSPS patsiendi ja 100 kontrolli *Per3* VNTR genotüpiseeriti PCR meetodil ning restrikteeriti NcoI ensüümiga, mis lõikab ainult 5 kordusega alleeli, kuna sel juhul ei toimu ülalmainitud positsioonis nukleotiidset asendust. Leiti, et *Per3*⁴ alleel on oluliselt seotud DSPS-ga, tulemus oli statistiliselt oluline ka peale *Bonferroni* korrektsiooni ($p = 0,037$, Ebisawa jt., 2001).

Ebisawa meetodile tuginedes viidi taoline katse läbi ka Inglismaal Surreys, kus leiti samuti, et *Per3* VNTR võib osutuda potentsiaalseks ekstreemse ööpäevase eelistuse geneetiliseks markeriks. 484 indiviidi täitsid MEQ, saadud skoori põhjal valiti genotüpiseerimiseks 35 kõrgeima ja 35 madalaima punktiarvuga inimest. Uuringusse lisati ka kontrollid (keskmise MEQ skooriga individid) ja 16 DSPS patsienti. Täheldati, et *Per3*⁵ alleelisagedus oli varajase kronotüübiga inimeste hulgas suurem kui hilise kronotüübiga inimeste hulgas. DSPS patsientide grupis oli *Per3*⁴ alleelisagedus aga märkimisväärselt kõrge (sagedus kogu uuritud populatsioonis 0,68), ning selles grupis ei leitud ühtegi *Per3* 5/5 genotüübiga inimest ($p = 0,0224$). See oli esimene uuring, mis otseselt näitas korrelatsiooni *Per3* VNTR-i ja ekstreemse kronotüübi vahel (Archer jt., 2003). Archeri tulemusi kinnitab Lõuna-Aafrikas Euroopa päritolu meessportlaste seas läbiviidud uuring, kus järelitati, et *Per3*⁴ alleeli kandvatel sportlastel võib olla raskem hommikustel võistlustel edu saavutamise ja *Per3*⁵ alleeli kandvatel on seevastu eeliseis (Kunorozva jt., 2012).

Per3 VNTR mõju kronotüübile on üritatud seostada ka vanusega. Uuring põhines eelnevalt kirjeldatud Archer jt., katsel. Leiti samuti, et *Per3*⁴ alleel on enim seotud hilisuse ning *Per3*⁵ alleel varasusega. MT ja NT inimeste alleelisagedustes ei märgatud olulist erinevust, küll aga nähti erinevust NT ja ET inimesi võrreldes ($p = 0,02$). Vanuse mõju lühikese alleeli esinemisele vaadeldi ekstreemsetel kronotüüpidel. Nähti, et vanuse kasvades liigub *Per3*⁴ alleelisagedus järjest lähemale populatsiooni keskmisele (0,68, Archer jt., 2003), kahanedes hilistel ning tõustes varajastel kronotüüpidel. Enim erines lühikese alleeli sagedus ekstreemidel 18–29 aastaste vanusegrupis (Jones jt., 2007). Arvatakse, et kirjeldatud tulemus saadi osalt seetõttu, et MEQ on vaatamata oma valideeringule välja töötatud just noori inimesi analüüsides (Ellis jt., 2009).

Leidub ka publikatsioone, mis ei leia üldse *Per3* VNTR-i ja kronotüübi vahel seost (Osland jt., 2011) või saavad kohati vastupidise seose (Pereira jt., 2005). Osland jt., uuringus osales 432 tervet üliõpilast Norrast, keskmise vanusega 22 eluaastat. Kõik nad jagunesid MEQ skoori alusel saadud kronotüübi põhjal Gaussi kõvera kujuliselt, kuid t-test ei näidanud olulist seost kummagi ekstreemse kronotüübi ja lühikese ning pika alleeli vahel. Saadi vaid

väga nõrk seos *Per3*⁵ alleeli ja hilisuse vahel ($p = 0,095$). Tulemus oli ootamatu, sest valimi tugevuseks oli ühtlus vanuses, rahvuses, hariduses ja ka sotsiaalses keskkonnas. Samas saadi alleelisagedustes ülejäänud maailmaga sarnane tulemus (*Per3*⁴ alleelisagedus 0,67, Osland jt., 2011). Pereira jt., uuring Brasiilias São Paulos hõlmas 156 europiidset päritolu indiviidi, kes jagunesid MEQ skoori alusel enam-vähem võrdselt varajaseks, keskmiseks ja hiliseks kronotüübigrupiks. Kaasati ka 17 DSPS patsienti, kellest 12 und uuriti kahe nädala jooksul põhjalikumalt (kehatemperatuuri ja melatoniini kontsentratsiooni määramised, aktimeeter). Genotüpiseerimise tulemused kinnitasid küll Archer jt., tulemusi (*Per3*⁴ alleeli esineb rohkem õhtuse eelistusega inimestel, Archer jt., 2003), kuid huvitaval kombel saadi DSPS indiviidide hulgas palju kõrgem *Per3*⁵ alleelisagedus (0,56) kui see oli üldises populatsioonis (0,34). Saadud tulemust saab seostada Brasiilia geograafilise asukohaga lõunapoolkeral, kus on tunduvalt erinev kliima ja päeva pikkus. Kuna kontrollide ja DSPS patsientide etniline taust oli suures osas sama Archeri töögrupi valitud indiviididega ja ka alleelide sagedused ühtisid, siis ei saa kirjeldatud katse tulemuste õigsuses kahelda (Pereira jt., 2005).

Per3 VNTR mõju inimese ööpäevase aktiivsuseperioodi eelistusele on tõestatud mitmeid kordi (Ebisawa jt, 2001; Archer jt, 2003; Ellis jt., 2009; Kunorozva jt., 2012; Lázár jt., 2012). Kuna on teada, et kronotüüp mõjutab osalt meie üldist tervislikku seisundit ja käitumist (Schneider jt., 2011; Gulec jt., 2013), siis on läbi viidud ka uuringuid, kus on vaadeldud *Per3* VNTR mõju näiteks bipolaarse häire kujunemisele (Benedetti jt., 2008), kroonilisele südamepuudulikkusele (Lipkova jt., 2012) ja ka rinnavähi kujunemisele (Zhu jt., 2005; Hansen jt., 2012). Bipolaarse häire puhul leiti, et *Per3*⁵ alleelikandjatel on eelsoodumus häire varasemale avaldumisele, mis omakorda põhjustab haiguse keskmisest raskemat kulgu (Benedetti jt., 2008). Kroonilise südamepuudulikkuse ja *Per3* polümorfismi vahel ei nähtud olulist seost (Lipkova jt., 2012), aga tulemused on statistiliselt olulised rinnavähi töödes, kus leiti, et *Per3*⁵ alleel nii homo- kui ka heterosügootses olekus suurendab rinnavähi riski noortel naistel (Zhu jt., 2005). Siinkohal on oluline spekuloida kellageenide võimalike uute funktsioonide üle. Arvatakse, et nad võivad kontrollida tuumori supressorgeenide ning rakujagunemisega seotud geenide ekspressiooni, reguleerides nii rakkude proliferatsiooni ja apoptoosi. Seega võivad geneetilised polümorfismid kellageenides olla potentsiaalseteks vähivormidele vastuvõtlikkuse soodustajateks (Fu ja Lee, 2003).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva töö praktilise osa esimeseks eesmärgiks oli kronotüübi ja teiste uneparameetrite hindamine Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu doonoritel ning tulemuste võrdlemine teistes populatsioonides saaduga. Teiseks eesmärgiks oli uurida *Per3* varieeruva arvuga tandemkorduse (rs57875989) seost kronotüübiga eestlaste populatsioonis.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Valim

Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramus aastatel 2007–2011 MCTQ küsimustikule vastanud indiviididest (41 229) valiti välja sobivad inimesed kindlate parameetrite alusel. Välja jäid järgnevate tunnustega doonorid:

- puudulikud või vastuolulised andmed;
- vahetustega töötamine;
- teatud ravimite kasutamine;
- alla nelja tunnine keskmine une pikkus;
- äratuskella kasutamine puhkepäevadel.

Koguvalimi suuruseks jäi esmalt 26 462 indiviidi, kellest rahvuselt eestlasi oli 81,1%. Lisas 3 on valimi vanuseline ja sooline jaotusgraafik.

Per3 geeni rs57875989 genotüpiseerimise valim koosnes 823 inimesest, kes valiti korrigeeritud kronotüübi (MSFsasc) väärtuse jaotusgraafiku mõlemast servast, 10% ekstreemide hulgast (Lisa 4). Lisakriteeriumiks oli vanus vahemikus 25–50 eluaastat ja eesti rahvus. Äärmuslikult varajasi kronotüüpe (MSFsasc = 02:12–02:59) valiti 407 (205 naist ja 202 meest) ning äärmuslikult hiliseid (MSFsasc = 05:19–06:23) 416 (216 naist ja 200 meest).

Käesolevas töös teostatavate uuringute läbiviimiseks on geenidoonorid andnud informeeritud nõusoleku ning on olemas Tartu Ülikooli inimuuringute eestika komitee luba.

2.2.2. Uneparameetrite arvutamine

Uneparameetrite arvutamisel tugineti MCTQ küsimustikus olevale informatsioonile. Doonorite poolt märgitud täpsete kellaaegade põhjal leiti järgnevad une ja ärkveloleku tsüklit iseloomustavad karakteristikud: SD_f, SD_w, AvSD, MSW, MSF, MSF_{sc}, MSFsasc ja ΔMS.

Valemid Microsoft Office Excel tarkvaraprogrammis läbiviidavateks arvutusteks (Lisa 1) on välja töötanud Till Roennebergi uurimisgrupp. Valemid on mõeldud ainult MCTQ uneküsimustiku täitnud indiviidide analüüsimiseks (Roenneberg jt., 2007a). Lisaks arvutatavatele parameetritele kaasati analüüsi ka une latentsi, mis on indiviidi enda antud subjektiivne hinnang sellest, kui mitu minutit kulub uinumiseks.

Arvutatud väärtuste põhjal on koostatud sagedusgraafikud ja histogrammid. Une pikkust ja puudujääki ning kronotüüpi kujutavate sagedusgraafikute jaoks on kasutatud poole tunni pikkuseid vahemikke, mis hõlbustab sarnaste parameetritega inimeste komplekteerimist. Histogrammide jaoks on leitud parameetritest keskvaärtused ja standardhälbed. P-väärtuste arvutamiseks on kasutatud hii-ruut testi ja t-testi.

2.2.3. Genotüpiseerimine

Geeni *Per3* 18. eksonis esineva polümorfismi, rs57875989 genotüpiseerimine teostati PCR meetodil. Praimerid pärinesid Benedetti jt., 2008. aasta tööst (pärisuunaline 5'-TGTCTTTTCATGTGCCCTTACTT-3' ja vastassuunaline 5'-TGTCTGGCATTGGAGTTTGA-3'). Reaktsioonisegu kogumaht oli 10 µl ja sisaldas 3,85 µl deioniseeritud vett, 1 µl reaktsioonipuhvrit (0,8 M Tris-HCl, 0,2 M (NH₄)₂SO₄, 0,2% w/v Tween 20, Solis BioDyne, Eesti), 1 µl MgCl₂-i (25 mM, Thermo Scientific, USA), 1 µl dNTP-de segu (2,5 mM dATP, dCTP, dTTP, dGTP, Thermo Scientific, USA), 1 µl mõlemat praimerit (10 pmol/µl, Metabion International AG, Saksamaa), 0,15 µl Hot FirePol Taq polümeraasi (5U/µl, Solis BioDyne, Eesti) ja 1 µl uuritavat DNA-d keskmise kontsentratsiooniga 80 ng/µl. Reaktsioon viidi läbi PCR masinas Applied Biosystems® 2720 Thermal Cycler.

Uuritav DNA piirkond amplifitseeriti järgneval PCR režiimil: algne denaturatsioon 12 minutit 95 °C juures, seejärel 36 tsüklit amplifikatsiooni (40 sek, 94 °C; 30 sek, 60 °C; 40 sek, 72 °C) ning lõpp elongatsioon 12 minutit 72 °C juures (Benedetti jt., 2008, modifitseeritud).

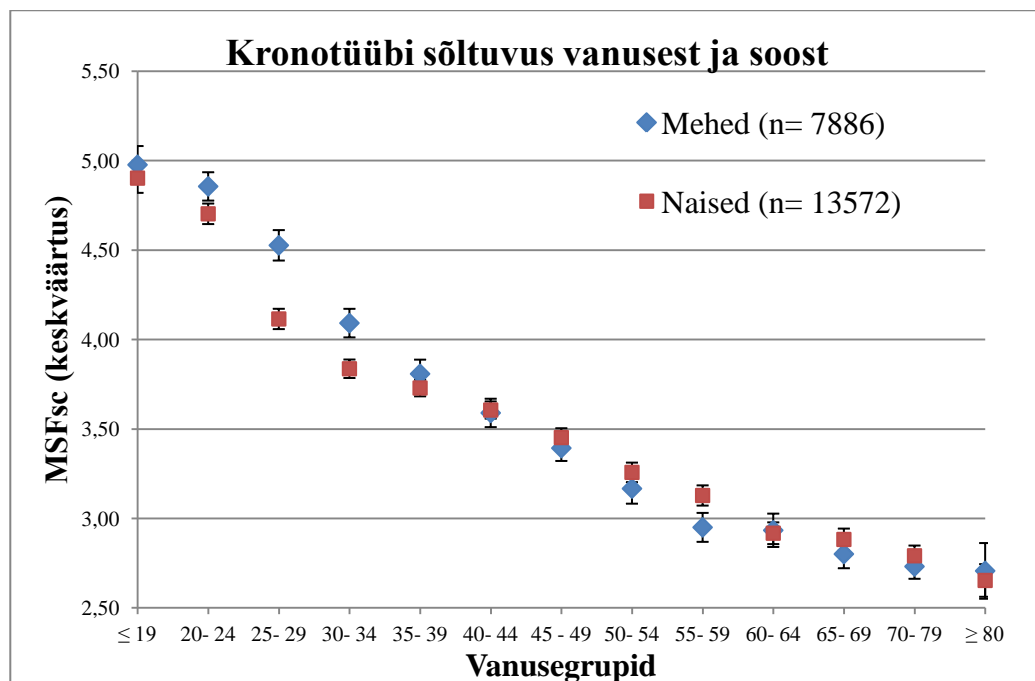
Produktid lahutati 2% agarosgeelil (Osland jt., 2011), mis võimaldas eristada 401 ap pikkust *Per3*⁵ alleeli 347 ap pikkusest *Per3*⁴ alleelist (Benedetti jt., 2008).

2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1. Uneparameetrid koguvalimis

Kronotüübi hindamiseks arvutasime une keskaegade väärtused tööpäeval ja puhkepäeval. Viimast peetakse parimaks kronotüüpi iseloomustavaks parameetriks. Ilmnes, et tööpäeval saabub une keskaeg valimis üldiselt tunni võrra varem kui puhkepäeval. Tööpäeval langes enim inimesi (47,6%) gruppi, kelle MSW jäi kella 02:30 ja 03:30 vahele, kuid puhkepäeval oli levinuim (30,5%) une keskaegade vahemik 03:30–04:30. Koguvalimist 23,3% inimestel oli unerežiim kõigil päeval sama ja seega ei esinenud neil erinevusi töö- ja puhkepäevade une keskaegade vahel. Samas kuna 61,7% inimestel oli erinevus 1–2 tundi ja ülejäänutel veel rohkem, tuli MSF väärtust korrigeerida tekkinud unevõla suhtes. Korrigeeritud parameetri (MSFsc) alusel osutusid kõige sagedasemaks (36,3%) kella 03:00 ja 04:00 vahelise kronotüübiga inimesed (Lisa 5).

MSFsc on sobilik parameeter iseloomustamiseks kronotüüpide erinevusi meeste ja naiste ning erinevate vanuseklasside vahel. Leidsime, et meeste MSFsc keskvärtus ($03:48 \pm 1:21$) on naiste MSFsc keskvärtusest ($03:37 \pm 1:08$) hilisem ehk une keskaeg meestel on keskmiselt 11,4 minutit hiljem kui naistel ($p < 0,001$). Seega on kronotüüp soost sõltuv tunnus. Saadud tulemust kinnitavad ka monosügootsete kaksikutega läbiviidud uuringud, kus on samuti leitud, et meestel on tugevam eelistus hilisusele ($p < 0,01$, Barclay jt., 2013). Lisaks soole, sõltub kronotüüp ka vanusest. Vanuse kasvades (alates 20ndatest) muutub kronotüüp varasemaks, seejuures säilivad soospetsiifilised erinevused. Meie populatsioonis olevate eestlaste põhjal ($n = 21\,458$) tehtud graafikult (Joonis 5) on näha, et mehed on kuni 40ndate aastateni hilisema kronotüübiga kui naised. Pärast 40ndaid muutuvad erinevused kronotüüpide vahel peaaegu olematuks. Ilmneb ka, et vanus ja kronotüüp on omavahel negatiivses korrelatsioonis ($r = -0,552$; $p < 0,0001$).



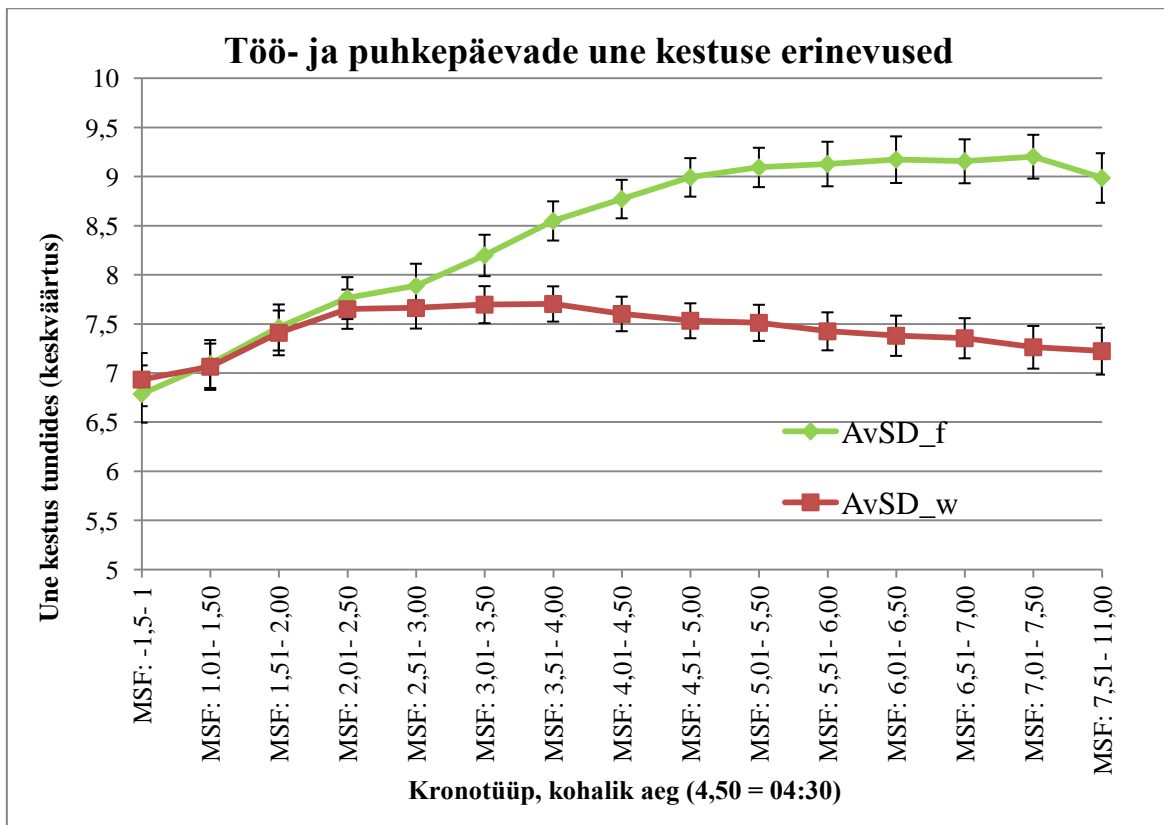
Joonis 5. **Kronotüübi sõltuvus vanusest ja soost.** Kronotüüp on määratud korrigeeritud une keskajaga puhkepäevadel (MSFsc). Eestlased (n = 21 458) vanuses 18–103 eluaastat. 95% usaldusintervallid.

Meie kogutud uneandmete põhjal ei õnnestunud noortel tuvastada maksimum kronotüübiväärtusele vastavat täpset vanust, mis peaks ilmnema üleminekul noorukieast täiskasvanuikku (Koskenvuo jt., 2007; Roenneberg jt., 2007a). Võimalik, et valimis ei ole piisavalt alla 19aastaseid indiviide, et täielikku vanuse ja kronotüübi seost välja tuua. Lisaks on meie valimi puhul noorte, kuni 20 aastaste naiste ja meeste kronotüüp oodatust sarnasem, kuigi selles vanuses ja järgneval kümnendil võiksid kronotüüpide erinevused olla maksimaalsed (Roenneberg jt., 2004). Võimalik, et selles mängib rolli naiste ja meeste erinev hulk valimis, meesdoonoreid (n = 7886) on peaaegu kaks korda vähem kui naisdoonoreid (n = 13 572).

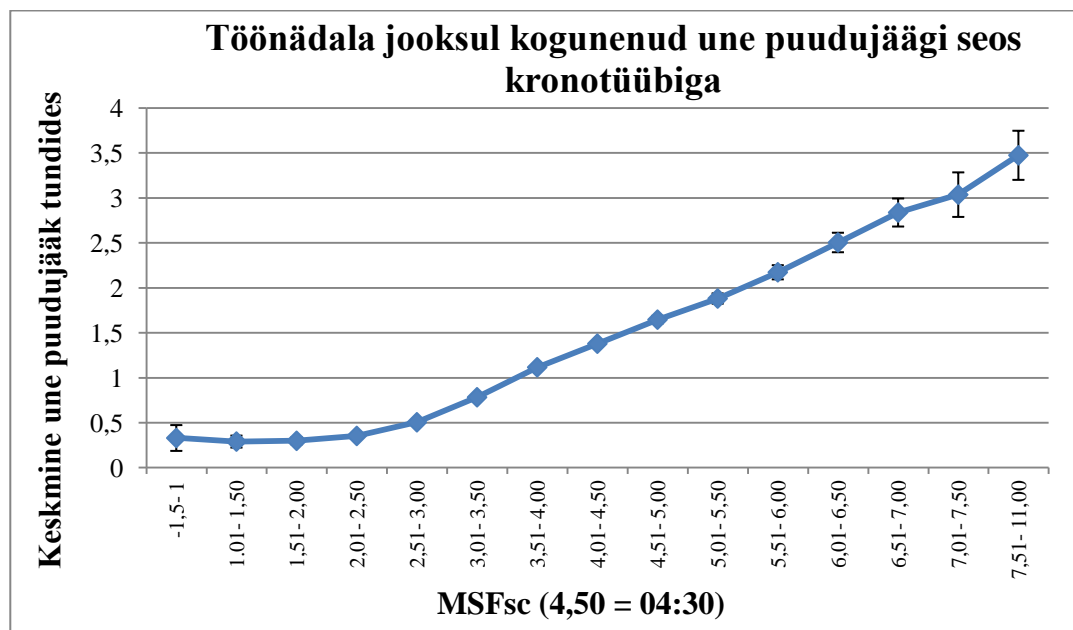
Kuna kronotüüpi mõjutab nii sugu kui vanus, siis korrigeeritakse puhkepäevade une keskaega lisaks unevõlale ka soo ja vanuse suhtes. Korrigeeritud parameetri (MSFsasc) alusel saadud jaotusgraafikut analüüsides, nägime, et 42,5% valimil saabus une keskaeg kella 03:30 ja 04:30 vahel. Seejuures ET inimesi oli populatsioonis rohkem kui MT inimesi. Ainult 26,2% inimestel oli korrigeeritud une keskaeg enne kella poolt nelja, samas kui 31,3% alles pärast kella poolt viit (Lisa 5). Meie populatsioonis leitud kronotüüpide jaotus ning seosed vanuse ja sooga on väga sarnased sellele, mis on leitud 55 000 Kesk-Euroopa inimese uneparameetrite analüüsimisel MCTQ andmeid kasutades (Roenneberg jt., 2007a).

Une pikkus ja kronotüüp on sõltumatud tunnused, samas eksisteerib oluline seos kronotüübi ja une kestuse vahel juhul, kui vaatame une kestust eraldi töö- ja puhkepäevadel. Tööpäevadel osutus levinuimaks (53,1%) 6,5–8 tunni pikkune une kestus, kuid puhkepäevadel 7,5–9 tunni pikkune une kestus (46,3%) (Lisa 6). Populatsioonis enim levinud (39,6%) keskmine une kestus jäi 7,5–8,5 tunni vahele. 35,5% inimestest magas keskmiselt vähem kui 7,5 tundi ja 25% magas kauem kui 8,5 tundi. Tulemused töö- ja puhkepäevade magamisharjumuste osas ühtivad keskeurooplastel läbiviidud uuringuga (Roenneberg jt., 2007a). Lisaks on nii meie kui ka mainitud Roennebergi uuring keskmise une kestuse arvutuste osas sarnane. Inimesi, kes magavad keskmiselt alla 7,5 tunni, on tunduvalt rohkem kui inimesi, kes magavad keskmiselt üle 8 tunni.

Edasises analüüsis tuginesime töö- ja puhkepäevade magamisharjumuste erinevusele ja tõsiasjale, et erinevused on suurimad just hilisemate kronotüüpidega indiviididel (Joonis 6). Nimelt inimestel, kelle une keskaeg puhkepäevadel on peale 02:00 öösel, oli statistiliselt oluline erinevus ($p = 0,004$) töö ja puhkepäevade une pikkuse vahel, ning neil, kelle une keskaeg on 02:30 või hiljem, osutus erinevus juba väga oluliseks ($p < 0,001$). Kirjeldatud erinevuste põhjal analüüsisime unevõla kuhjumist tööädala jooksul eestlastel ($n = 21\,458$). Ilmnes selge korrelatsioon kronotüübi hilisemaks muutumise ja une puudujäägi tekke suurenemise vahel ($r = 0,62$, $p < 0,001$, Joonis 7). Meie tulemus ühtib uuringuga, kus leiti samuti, et maksimaalse une puudujäägi all kannatavad kõige hilisema kronotüübiga inimesed, sest nad peavad pidevalt oma harjumusi sotsiaalsete nõuete järgi muutma. Kõige väiksem une puudujääk on mainitud uuringu kohaselt NT inimestel, kelle une keskaeg on nii töö- kui ka puhkepäevadel enamvähem samal ajal, ca 03:00 varahommikul (Wittmann jt., 2006). See on mõistetav, sest sotsiaalne kell äratab ET inimesed liiga vara tööpäevadel ja bioloogiline kell äratab MT inimesed liiga vara puhkepäevadel, kuid NT inimesi see probleem nii tugevalt ei mõjuta (Roenneberg jt., 2003).



Joonis 6 Koguvalimi erinevatesse kronotüübigruppidesse kuuluvate indiviidide töö- ja puhkepäevade keskmiste unepikkuste erinevused. N = 26 462, vanusevahemik 18–103 eluaastat. Indiviidid on jaotatud pooltunnistesse kronotüübivahemikesse puhkepäevade une keskaja alusel. 95% usaldusintervallid. Alates MSF väärtusest 02:30, muutub erinevus töö- ja puhkepäevade une kestuses statistiliselt väga oluliseks ($p < 0,0001$).

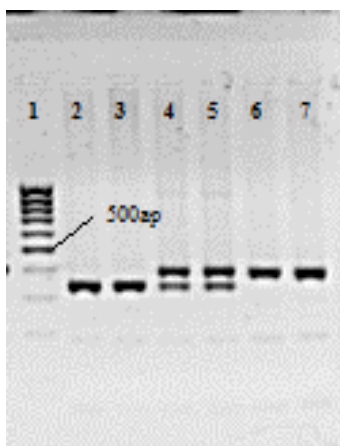


Joonis 7. Töönädala jooksul kogunenud une puudujäägi seos kronotüübiga. Valimis on koguvalimist eestlased ($n = 21\,458$) vanuses 18–103 eluaastat. indiviidid on jaotatud pooltunnistesse kronotüübivahemikesse puhkepäevade korrigeeritud une keskaja (MSFsc) alusel. 95% usaldusintervallid (kohati sama suured, kui punkt ise).

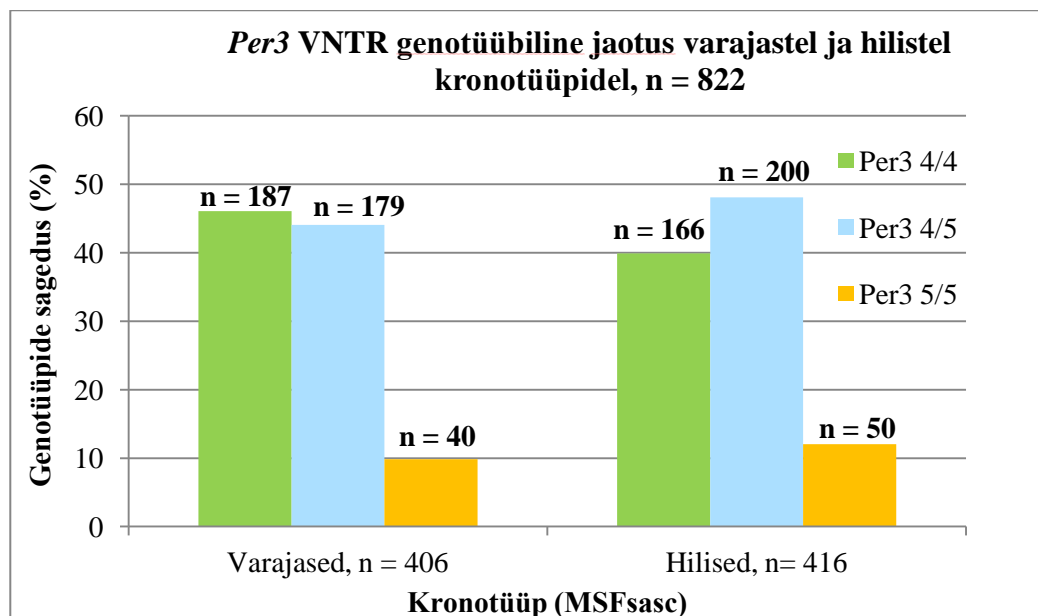
Eestlaste populatsioonis uneparametreid analüüsides nägime, et töönädal mõjutab inimeste uneharjumusi. Lisaks nägime ka kronotüübi sõltuvust soost ja vanusest. Kuna on olemas algoritm, mille abil saab kronotüüpi soo, vanuse ja töönädala jooksul kogunenud unevõla alusel standardiseerida, lihtsustab see epidemioloogilisi uuringuid kronobioloogias. Viimane on omakorda oluline, sest fenotüübi täpsem määramine on abiks edasisteks geneetilisteks uuringuteks.

2.3.2. *Per3* VNTR polümorfismi mõju kronotüübile

Edukalt õnnestus genotüpiseerida 822 indiviidi (Joonis 8). Ühe ekstreemselt varajase indiviidi *Per3* VNTR polümorfism jäi välja selgitamata ja teda edasistesse uuringutesse ei kaasatud. Valim rahuldab Hardy-Weinbergi tasakaaluseadust ($\chi^2 = 0,61$, $df = 1$, $p = 0,434$). Täpsem genotüüpide jaotus valitud ekstreemide hulgas on välja toodud Joonisel 9.



Joonis 8. *Per3* geeni lõigu amplifikatsioon. Esimesel rajal on DNA molekulmassi marker (*GeneRuler 100 bp DNA Ladder*, Thermo Scientific, USA). Radadel 2 ja 3 on näha *Per3*⁴ homosügootid, radadel 6 ja 7 *Per3*⁵ homosügootid, ning radadel 4 ja 5 on heterosügootid. *Per3*⁴ alleeli sisaldava lõigu pikkus on 347 aluspaari ja *Per3*⁵ alleeli sisaldava lõigu pikkus on 401 aluspaari.



Joonis 9. **Genotüüpide jaotus valitud ekstreemide hulgas.** Tulba kõrgus tähistab genotüübi sagedust varajases ja hilises kronotüübigrupis. Tulpade kohal on vastava genotüübiga inimeste hulk vastavas kronotüübigrupis.

*Per3*⁴ alleelisageduseks kujunes kogu genotüpiseeritud valimis (n = 822) 0,66 ning *Per3*⁵ alleelisageduseks 0,34. Saadud sagedused ühtivad teistel Euroopa rahvustel arvatud sagedustega (Nadkarni jt., 2005; Ciarleglio jt., 2008). Valitud hiliste indiviidide hulgas oli *Per3*⁴ alleelisagedus 0,64 ning valitud varajaste indiviidide hulgas 0,68, mis osutab sellele, et meie valimis puuduvad erinevused alleelisagedustes ekstreemsete kronotüüpide vahel. Ilmnes, et meie genotüpiseerimiseks valitud indiviidide hulgas ei erinenud *Per3* genotüübi-sagedused oluliselt valitud ekstreemsete kronotüübigruppide vahel. Seega, oodatud seost *Per3* 5/5 genotüübi ja varajase kronotüübi vahel ei eksisteeri (p = 0,148). Kõigis kolmes genotüübigrupis MSFsasc keskväärtust analüüsides ilmnes kõige hilisem kronotüüp *Per3* 5/5 indiviididel (MSFsasc = 04:20 ± 1:24) ja kõige varasem kronotüüp *Per3* 4/4 indiviididel (MSFsasc = 04:07 ± 1:25). Heterosügootidel jäi korrigeeritud une keskaeg homosügootide une keskaegade vahele (MSFsasc = 04:16 ± 1:25). Teadaolevalt võib seost *Per3* 5/5 ja varasema kronotüübi vahel mõjutada KMI. Hiljuti on näidatud, et *Per3* 5/5 homosügootid on pigem hilisema kronotüübiga, kui nende KMI on keskmisest kõrgem (Lázár jt., 2012). Kontrollides KMI väärtust meie indiviididel, jäi kõigil genotüüpidel, MSFsasc väärtusest olenemata, KMI keskväärtus 25 ja 26 vahele ning valimis ülekaalulisi ei esinenud (standardhälvet arvestades). Seega meie valimis KMI saadud tulemusi ei mõjutanud. Arvestades tõsiasja, et indiviidid valiti ekstreemse MSFsasc väärtuse põhjal on ülaltoodud keskmise une keskaja erinevused genotüüpide vahel suure tõenäosusega ebaolulised, sest keskväärtuse arvutamisel genotüüpide gruppides neutraliseerisid hiliste ja varajaste, vastavalt suured ja väikesed MSFsasc väärtused teineteist.

Käesolev uuring ei ole ainuke, milles ei õnnestunud identifitseerida *Per3* VNTR polümorfismi mõju kronotüübile. Mõnedes teistes populatsioonides, nt Norras ja Koreas, on samuti saadud statistiliselt ebaolulisi tulemusi (Kang jt., 2011; Osland jt., 2011).

Üldlevinud kontseptsiooni kohaselt reguleerivad und kaks ostsilleerivat protsessi: une homöostaas ja tsentraalne tsirkadiaanne süsteem. Need protsessid on omavahel interaktsioonis. Homöostaasi protsess väljendab ööpäevast „une pressi“ muutumist. Ärgates on see kõige väiksem ja kuhjub päeva jooksul, kuni ületab läve, millest edasi inimene ei suuda enam ärkvel olla. Ööune jooksul inimene taastub ja hommikuks jõuab „une press“ jälle miinimumi (Borbély, 1982). Mongrain jt., on tõestanud elektroentsefalograafilisi uuringuid läbi viies, et varajased ja hilised kronotüübid ei erine une regulatsioonil üksteisest mitte ainult tsirkadiaanse aspekti poolest vaid ka une homöostaasilt. Nimelt varieerub erineva kronotüübiga inimeste deltaaktiivsuse absoluutne amplituud sügavas unes pikiaju anteroposterioorset gradienti. Eesmistes piirkondades algab MT indiviididel uneepisood kõrgema deltaaktiivsusega kui ET indiviididel. Suurim erinevus ilmneb aga deltaaktiivsuse languse kiiruses, mis on maksimaalne MT indiviididel. See omakorda tähendab, et MT indiviididel on õhtu saabudes suurem ja hommikul väiksem „une press“ (Mongrain jt., 2006a). Seega võib öelda, et nii homöostaas kui tsirkadiaansed protsessid mõjutavad kronotüübi väljakujunemist üksteisest sõltumatult (Mongrain jt., 2006b).

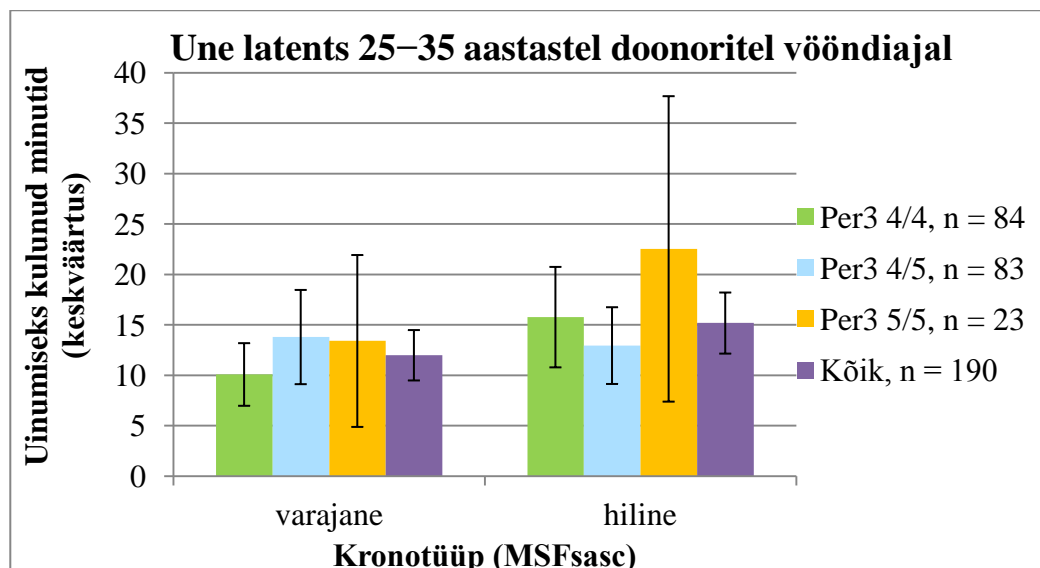
Võimalik, et *Per3* VNTR polümorfismil on suurem efekt hoopis une homöostaasile ja ärkveloleku kognitiivsele võimekusele, tingides nii indiviidide aktiivsusperioodi eelistustes erinevusi ja mõjutades krontüüpi kaudselt (Viola jt., 2007). Spekulatsiooni kinnitab *knock-out* hiirtega läbiviidud uuring, kus avastati, et erinevalt *Per1*-st ja *Per2*-st, ei ole *Per3* geen piisav juhtimaks tsirkadiaanset rütmi teiste *Period* geenide abita (Bae jt., 2001).

Per3 5/5 indiviididel on leitud varajase kronotüübiga kattuvaid karakteristikuid. Neil on lühem une latents, rohkem sügava une faase ja deltaaktiivsust. Lisaks esineb neil kiires ehk paradoksaalses unes enam alfaaktiivsust kui *Per3* 4/4 indiviididel. *Per3*⁵ alleeli suhtes homosügootsetel inimestel on seega suurem „une press“ (uinuvad kergemini) kui teistel genotüüpidel (Dijk ja Archer, 2010). Ka on näidatud, et võrreldes *Per3* 4/4 indiviididega on *Per3* 5/5 homosügootid tundlikumad une deprivatsioonile. Totaalse unepuuduse järgselt teostatud vaimse võimekuse uuringud näitasid, et kui öö alguses ei olnud eri genotüüpidel inimeste võimekuse vahel olulist erinevust, siis 2–4 tundi peale melatoniini maksimumi, olid *Per3* 5/5 indiviidide sooritused *Per3* 4/4 indiviididest tunduvalt kehvemad (Groeger jt., 2008, Dijk ja Archer, 2010).

Per3 VNTR polümorfismi mõju nii kronotüübile (Archer jt., 2003; Lázár jt., 2012) kui ka une struktuurile (erinevused elektroentsefalogrammis sügava ja kiire une faaside ajal) on eelkõige tuvastatud nooremaid (18–30 a) indiviide analüüsides (Viola jt., 2007). Seetõttu otsustasime analüüsida une homöostaasiga seotud parameetreid meie 2535 aastastel genotüpiseeritud doonoritel. Valisime inimesed kes olid täitnud MCTQ uneküsimustiku vööndiajal. Viimane kriteerium oli oluline, sest on teada, et vööndi- ja suveaeg võivad mõjuda indiviidide uneharjumustele erinevalt (Roenneberg jt., 2007b). Pärast mainitud kriteeriumite rakendamist jäi indiviide järgi 191, kellest MT inimesi oli 91 (43 *Per3* 4/4, 36 *Per3* 4/5 ja 12 *Per3* 5/5 indiviidi) ja ET inimesi 100 (41 *Per3* 4/4, 48 *Per3* 4/5 ja 11 *Per3* 5/5 indiviidi). Sellise alavalimi genotüüpide ja alleelide sagedused ei erinenud oluliselt kõigi 822 indiviidid genotüpiseerimisel saadud genotüüpide ja alleelide sagedustest (Lisa 7) ja seega ei avaldu ka siin *Per3* VNTR mõju kronotüübile.

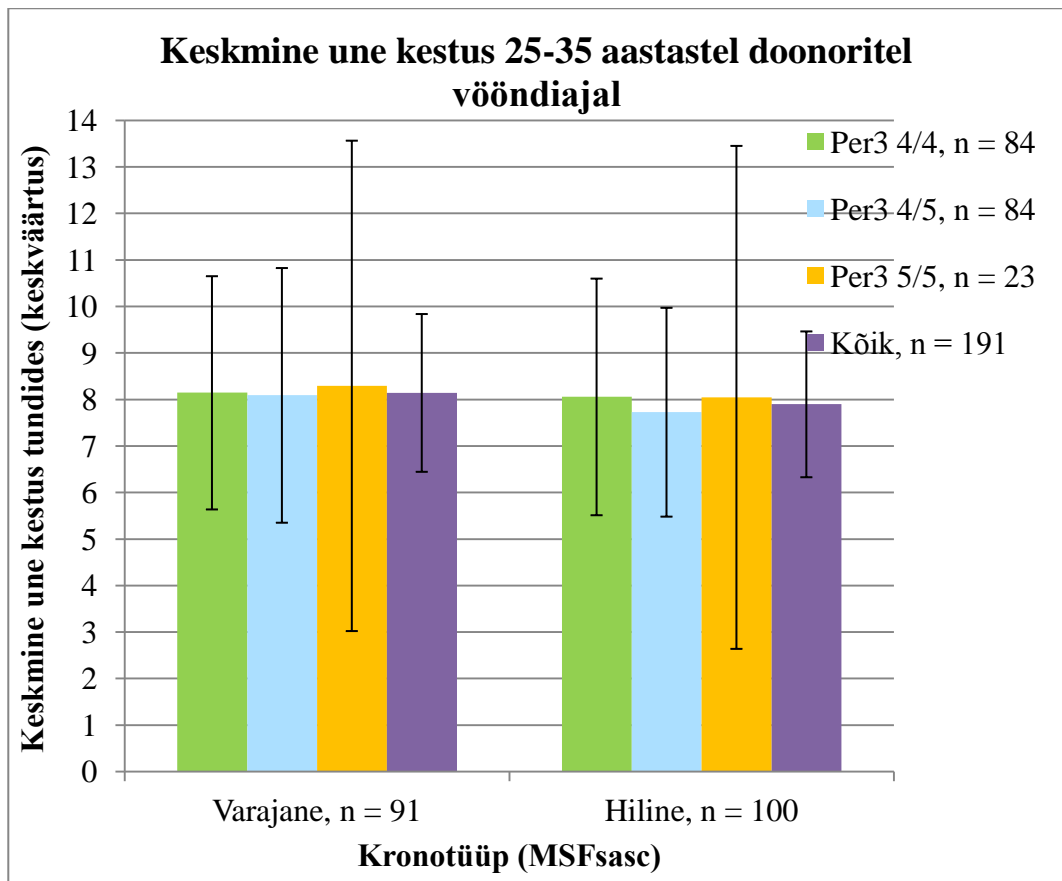
Meie doonoritel kasutatud MCTQ uneküsimustik võimaldas une homöostaasi hinnata kahe parameetri, latentsi ja keskmise kestuse alusel. Une alguse ja lõpu aega ei saanud hinnata seetõttu, et genotüpiseerimiseks valiti teadlikult äärmuslikud kronotüübid, mis tähendab, et valiku tegemisel olid aluseks une alguse ja lõpu aegade vahelised erinevused, samas kui une latents ja une pikkus valikult otseselt ei mõjutanud.

Kirjanduses on levinud leiuks *Per3* 5/5 genotüübi seos väiksema une latentsiga. Seda on kirjeldatud nii usaldusväärsetes laboratoorsetes uuringutes (Groeger jt., 2008; Dijk ja Archer, 2010) kui ka analüüsides MCTQ uneküsimustikus kirjeldatud subjektiivset puhkepäevade une latentsi (Lázár jt., 2012). Väiksemat une latentsi on täheldatud ka varajase kronotüübiga inimestel (Soehner jt., 2011). Meie valimis ilmnes MT indiviidide seas kõige suurem une latents puhkepäevadel heterosügootidel ($13,8 \pm 16,1$ min) ja kõige väiksem latents *Per3* 4/4 homosügootidel ($10,1 \pm 8$ min), samas kui ET indiviidide seas oli heterosügootidel minimaalne (13 ± 9 min) ja *Per3* 5/5 homosügootidel maksimaalne ($22,5 \pm 17$ min) une latents (Joonis 9). Mainitud erinevused une latentsis ei olnud aga varajaste ja hiliste kronotüüpide gruppidesse kuuluvate sama genotüübiga noorte doonorite vahel ning ka kronotüüpide vahel (genotüüpe arvestamata) statistiliselt olulised ($p > 0,09$). Küll aga koguvalimis ($n = 822$), genotüüpe arvestamata, saime kindlalt väita, et valitud ekstreemsetel MT indiviididel on väiksem une latents ($10,9 \pm 10,8$ min) kui valitud ekstreemsetel ET indiviididel ($13,7 \pm 12,8$ min) ($p < 0,0001$). Hetkel ei võimalda meie valim näha, kas ja kui suurt mõju avaldab *Per3* polümorfism viimasena mainitud puhkepäevade une latentsi erinevustele ekstreemsete kronotüüpide vahel.



Joonis 9. Une latents 25–35 aastastel doonoritel võõndiajal. 191 doonorist määrati latents 190-l, ühe indiviidi une latents jäi väljapoole neljakordset standardhälvet ja see eemaldati. Lillad tulbad ei arvesta *Per3* genotüüpi vaid põhinevad kronotüübil. 95% usaldusintervallid

Keskmine une kestus (töö- ja puhkepäevi kokku arvestades, Joonis 10) oli genotüpiseerimise valimis kõige pikem *Per3* 5/5 homosügootidel ja kõige lühem heterosügootidel, seda nii varajases (*Per3* 5/5 AvSD = 8:18 ± 1 h, *Per3* 4/5 AvSD = 8:06 ± 1:06 h) kui ka hilises (*Per3* 5/5 AvSD = 8:05 ± 1:13, *Per3* 4/5 AvSD = 7:44 ± 1 h) kronotüübigrupis. Varajased ja hilised *Per3* 4/4 homosügootid magasid vastavalt 8:15 ± 1 ja 8:00 ± 1 tundi. Valimis esinevaid keskmisi une kestusi analüüsides ilmnes, et varajase kronotüübiga individid magasid keskmiselt kauem (8:08 ± 1 h) kui hilise kronotüübiga individid (07:54 ± 1 h). Erinevus jäi püsima, kui arvestasime ka doonorite genotüüpe. Samas ei olnud erinevused ühelgi mainitud juhul statistiliselt olulised ($p > 0,05$). Ebaolulisus erinevustes võib olla järjekordseks tõestuseks, et kronotüüp ja keskmine une kestus on üksteisest sõltumatud tunnused. Meie tulemusi kinnitavad varem publitseeritud elektroentsefalograafilised uuringud, kus samuti ei leita olulist seost *Per3* VNTR genotüübi ja keskmise une kestuse vahel (Viola jt., 2007; Archer jt., 2008).



Joonis 10. **Keskmine une kestus 25–35 aastastel doonoritel vööndiajal.** Lillad tulbad ei arvesta *Per3* genotüüpi vaid põhinevad kronotüübil. 95% usaldusintervallid

Võimalik, et polümorfismi mõju paremaks analüüsimiseks ja äraspidiste tulemuste vältimiseks oleksime pidanud inimeste valikul lähtuma nende genotüübist mitte aga MCTQ põhjal määratud kronotüübist. Hoolimata sellest, et kasutatud MCTQ on usaldusväärne, jääb see uneküsimustik ikkagi subjektiivseks. Meil puuduvad tõendid, et äärmuslikeks kronotüüpideks valitud indiviidid, olenemata oma 2,5–4 tunnisest une keskaegade erinevusest, ikkagi olid ekstreemid. Paljud varem publitseeritud positiivsete tulemustega uuringud on kasutanud MEQ uneküsimustikku (Archer jt., 2003; Jones jt., 2007). Meie tehtud katse käigus suurendab veapiire *Per3*⁴ alleeli kõrge sageduse tõttu saadud *Per3* 4/4 ja *Per3* 5/5 genotüübiga inimeste liialt erinev hulk (4/4 homosügoote sattus katse valimisse $n = 822$ ja alavalimisse $n = 191$ peaaegu neli korda rohkem kui 5/5 homosügoote). Eelnevast tulenevalt on neid genotüübiklasse omavahel keeruline võrrelda. Usutav on ka, et meie valimi vanuseline vahemik oli liialt suur, sest siiani on enim publitseeritud uuringutes kasutatud nooremaid inimesi, vanuses keskmiselt 18–30 eluaastat (Archer jt., 2003; Lázár jt., 2012). On täheldatud, et vanemate inimeste (eelkõige 40–49) ööpäevase aktiivsuseperioodi eelistus on vähemal määral mõjutatud genotüübist ja rohkemal määral mõjutatud sotsiaalsetest faktoritest, nt perekondlikud kohustused või tööritiin, samas kui noorematel on Päikese kell ja bioloogiline kell omavahel tugevamas sünkronisatsioonis (Jones jt., 2007).

KOKKUVÕTE

Une ja aktiivsusperioodi vaheldumise rütmi regulatsioon on väga kompleksne, seda mõjutavad paljud kellageenid ja nende interaktsioon väliskeskkonnaga, aga ka une homöostaas. Une- ja aktiivsusperioodi ööpäevase eelistuse alusel jaotuvad inimesed normaaljaotuse järgi erinevateks kronotüüpideks, skaalal varajastest hilisteni.

Bakalaureusetöö eksperimentaalses osas analüüsisime TÜ Eesti Geenivaramu doonorite ($n = 26\,462$) uneparameetreid MCTQ küsimustiku abil kogutud andmete alusel. Leidsime et nn keskmise kronotüübiga inimestel (42,5%) jääb korrigeeritud une keskaeg kella 03:30–04:30 vahele. Selgus, et hilise kronotüübiga inimeste hulk ületab varajase kronotüübiga inimeste hulga. Leidsime ka, et mehed on naistest üldiselt hilisema kronotüübiga ja mõlema soo kronotüüp muutub vanuse kasvades varasemaks. Sagedasemaks (39,6%) keskmiseks une kestuseks oli meie koguvalimis 7,5–8,5 tundi. Kõik need leiud on väga sarnased 55 000 Kesk-Euroopa indiviidi MCTQ uneandmete analüüsil saadud leidudega. Lisaks nägime, et kronotüübi hilisemaks muutumisega kaasneb une puudujäägi kuhjumine töönädala jooksul, sest mida hilisem on puhkepäevade une keskaeg seda suuremad on erinevused töö- ja puhkepäevade une kestuse vahel. Mainitud positiivse korrelatsiooni ($r = 0,62$, $p < 0,001$) tõttu on just äärmuslikel kronotüüpidel bioloogiline ja sotsiaalne kell omavahel vastuolus. See tähendab, et nad ei suuda endale bioloogiliselt mittesobival, kuid ühiskonnas levinud tööajal, efektiivselt tegutseda. Mainitu all kannatab nii ühiskond, kui ka indiviidi isiklik elukvaliteet, sest elamine nihkes bioloogilise kellaga tekitab une puudujääki, mis omakorda võib põhjustada suitsetamist ja alkoholi liigtarvitamist, psühholoogilisi probleeme, ning kehakaaluga seotud tervisehäireid.

Une- ja ärkveloleku tsükli keerulises regulatsioonis on geneetikal teadaolevalt 46–52% suurune osakaal. Kellageenide transkriptsiooni tsirkadiaansete rütmide uurimisel on ilmnunud tugev korrelatsioon tsirkadiaanse rütmi markerite (melatoniin ja kortisool) ja *Per3* geeni ekspressiooni vahel. Seega on põhjust arvata, et polümorfismid selles geenis võivad muuta une- ja ärkveloleku tsüklit. Bakalaureusetöö raames äärmuslike kronotüübiga inimeste *Per3* varieeruva arvuga tandemkorduse (rs57875989) genotüpiseerimisel osutus *Per3*⁴ alleelisageduseks 0,66. *Per3* 4/4 genotüübiga inimesi oli 43% ja *Per3* 5/5 genotüübiga 11%. Üldlevinud arusaamaks on, et *Per3* 5/5 homosügootid on pigem varajase kronotüübiga inimesed. Võrreldes *Per3* 4/4 homosügootidega, paistab neil olevat pikem keskmine une kestus, lühem une latents, suurem une press õhtul, enam deltaaktiivsust öö algul ning vähem hommikul. Meil paraku ei õnnestunud oma valimi ($n = 822$, 25–50 a.) analüüsil leida olulist

seost *Per3* 5/5 genotüübi ja varajase kronotüübi vahel ($p = 0,148$). Une homöostaasi ja genotüübi omavahelise seose uurimiseks kasutasime puhkepäevade une latentsi ja keskmist une kestust. Genotüpiseeritud nooremate 25–35 aastaste doonorite subjektiivses une latentsi väärtuses vööndiajal puudusid äärmuslikes kronotüüpide klassides erinevate genotüüpidega inimeste latentsi keskväärtusi võrreldes olulised seosed ($p > 0,09$). Olgugi, et 25–50 aastaste vanuseklassis, genotüüpe arvestamata, oli varajastel kronotüüpidel une latents väiksem kui hilistel kronotüüpidel ($p < 0,0001$). Keskmise une kestus oli nii varajastel kui hilistel kronotüüpidel suurim *Per3* 5/5 homosügootidel ja väikseim heterosügootidel ($p > 0,05$). Erinevuse ebaolulisus võib olla tingitud sellest, et üldiselt peetakse kronotüüpi ja une kestust üksteisest sõltumatuks tunnuseks.

Uneparameetrite analüüsidel, nii ekso- kui ka endogeenseid faktoreid arvestades, saadakse tihtilugu väga varieeruvaid tulemusi. Seega on endogeense kellamehhanismi, une homöostaasi ja väliskeskkonnast tulevate tegurite mõju hindamiseks kronotüübi kujunemisele vaja teha edasisi uuringuid. *Per3* geeni uuringutes tuleks hinnata ka mitmete teiste selle geeni polümorfismide mõju. Meie edasistesse plaanidesse kuulub *Per3* geeni promootorist avastatud ühenukleotiidsete polümorfismide uuring, kuivõrd need võivad mõjutada *Per3* valgu ekspressioonitaset ja seeläbi ka organismi ööpäevast aktiivsuse rütmi.

Analysis of The Sleep-Wake Cycle Based on The Data of The Estonian Biobank Donors

The Influence of *Per3* VNTR rs57875989 on Sleep Parameters

SUMMARY

Jaanika Moro

Sleep is a complex trait, we still do not exactly know what is behind it, but we do know that it is regulated by two main components, the circadian and the homeostatic component. The centre of the circadian component is suprachiasmatic nucleus that drives melatonin and core body temperature rhythms and synchronizes all our cells into one circadian rhythm and our body to Earth's 24-hour day and night rhythm. Independent from the circadian component is sleep homeostasis that implicates sleep-wake cycle through sleep pressure, sleep stages and sleep latency. Both of these components are influenced by genes, environmental factors and the interaction of these two.

Sleep-wake cycle among people varies, partly because the ability to synchronize our external (Sun) and internal (hormones) time varies. When people differ in this ability, they are referred to as different chronotypes. The aim of this research was to estimate chronotype, other sleep parameters and their association with VNTR polymorphism in clock gene *Per3*.

For the analysis we used MCTQ data from the Estonian Genome Centre (n = 26.462). Chronotype has a bell-shaped distribution in the population, and is best described by the mid-sleep on free days (MSF). As the mid-sleep on workdays (02:30–03:30, 47.6%) is different from the mid-sleep on free days (03:30–04:30, 30.5%), it has to be corrected for sleep debt accumulating during the workweek. Last parameter is excellent for revealing sex and age differences in chronotypes. We found men and younger people to be later chronotypes than women and elderly, respectively. After correcting mid-sleep further for age- and sex-dependent changes (MSFsasc), the most frequent chronotype (42.5%) in our population had mid-sleep between 03:30 and 04:30. We also studied sleep duration. 39.6% of the population slept on average for 7.5–8.5 hours. Although sleep duration and chronotype are considered to be independent from each other, the fact that, the later the chronotype, the greater the difference between work and free day sleep durations, shows that these two traits are not totally independent. This correlation is the result of the sleep deprivation accumulating in later chronotypes during the workweek, which in turn may lead to psychological problems, excessive alcohol consumption and sometimes even to obesity and heart problems.

There is evidence that VNTR polymorphism (rs57875989) in *Per3* coding region might have an influence on chronotype and on sleep homeostasis especially because *Per3* rhythm correlates strongly with melatonin and cortisol rhythms. For confirming the influence on chronotype and on homeostasis, we genotyped extreme chronotypes (2.5–4 h difference in MSFsasc, aged 25–50, n = 822). *Per3*⁴ allele frequency was 0.66. Unfortunately, like some other studies, we could not distinguish the association between *Per3* 5/5 genotype and earlier chronotype ($p = 0,148$). For estimating the association between *Per3* genotype and homeostasis, we used subjective sleep latency on free days and average weekly sleep duration. Both of these parameters were analysed on 25 to 35-year-olds and on standard zone time, but the results were not statistically significant. Despite of the fact that extreme morning types had shorter sleep latency than extreme evening types ($p < 0.0001$), latency between same genotypes in different chronotype groups did not differ significantly ($p > 0.09$). People carrying two 5 repeat alleles, had the longest and people carrying 4 and 5 repeat alleles had the shortest average sleep duration in both extreme chronotype groups, but again, the difference was not statistically significant ($p > 0.05$).

Researches analysing associations between *Per3* VNTR and sleep parameters are overall controversial. This demonstrates the fact that mechanisms underlying sleep-wake cycle regulations are to this time still unknown and worthy of investigation. Further *Per3* VNTR studies should also take into account single nucleotide polymorphisms recently found from the promoter region, because they are likely to have an impact on the PER3 protein expression and through that an impact on circadian rhythms. Also, it might be interesting to study *Per3* VNTR in breast cancer patients, because breast cancer is associated with an exceptionally high rate of sleep problems and therefore *Per3* polymorphism is considered to be one of the risk factors of this cancer.

TÄNUSÕNAD

Sooviksin tänada kõiki häid inimesi, kes mulle bakalaureusetöö koostamisel ja kirjutamisel abiks olid. Kõige rohkem tänan oma juhendajat Maris Teder-Lavingut, kes mind hea nõu ja jõuga abistas. Samuti tänan professor Andres Metspalu ja Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu doonoreid.

KIRJANDUSE LOETELU

A) Ajakiri

- Adan, A., Archer, S. N., Paz Hidalgo, M., Di Milia, L., Natale, V., Randler, C. (2012). Circadian Typology: A Comprehensive Review. *Chronobiology International*. 29: 1153-1175
- Akashi, M., Tsuchiya, Y., Yoshino, T., Nishida, E. (2002). Control of Intracellular Dynamics of Mammalian Period Proteins by Casein Kinase I ϵ (CKI ϵ) and CKI in Cultured Cells. *Molecular and Cellular Biology*. 22: 1693-1703
- Allebrandt, K. V., Roenneberg, T. (2008). The search for circadian clock components in human: new perspectives for association studies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 41: 716 -721
- Allebrandt, K. V., Teder-Laving, M., Akyol, M., Pichler, I., Müller-Myhsok, B., Pramstaller, P., Mellow, M., Meitinger, T., Metspalu, A., Roenneberg, T. (2010). *CLOCK* Gene Variants Associate with Sleep Duration in Two Independent Populations. *Biological Psychiatry*. 67: 1040-1047
- Archer, S. N., Robilliard, D. L., Skene, D. J., Smits, M., Williams, A., Arendt, J., von Schantz, M. (2003). A Length Polymorphism in the Circadian Clock Gene *Per3* is Linked to Delayed Sleep Phase Syndrome and Extreme Diurnal Preference. *SLEEP* 26: 413-415
- Archer, S. N., Viola, A. U., Kyriakopoulou, V., von Schantz, M., Dijk, D.-J. (2008). Inter-Individual Differences In Sleep Timing and Entrained Phase of Endogenous Circadian Rhythms of BMAL1, PER2 and PER3 mRNA in Human Leukocytes. *Sleep*. 31: 608-617
- Arendt, J. (2006). Melatonin and Human Rhythms. *Chronobiology International*. 23: 21-37
- Aton, S. J., Herzog, E. D. (2005). Come together, right...now: synchronization of rhythms in a mammalian circadian clock. *Neuron*. 48: 531-534
- Bae, K., Jin, X., Maywood, E. S., Hastings, M. H., Reppert, S. M., Weaver, D. R. (2001). Differential Functions of *mPer1*, *mPer2*, and *mPer3* in the SCN Circadian Clock. *Neuron*. 30: 525-536
- Barclay, N. L., Eley, T. C., Mill, J., Wong, C. C. Y., Zavos, H. M. S., Archer, S. N., Gregory, A. M. (2011). Sleep Quality and Diurnal Preference in a Sample of Young Adults: Associations with *5HTTLPR*, *PER3*, and *CLOCK 3111*. *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)*. 156: 681-690
- Barclay, N. L., Eley, T. C., Parson, M. J., Willis, T. A., Gregory, A. M. (2013). Monozygotic Twin Differences in Non- shared Environmental Factors Associated with Chronotype. *Journal of Biological Rhythms*. 28: 51-61
- Benedetti, F., Dallaspesza, S., Colombo, C., Pirovano, A., Marino, E., Smeraldi, E. (2008). A length polymorphism in the circadian clock gene *Per3* influences age at onset of bipolar disorder. *Neuroscience Letters*. 445: 184-187
- Bjorvatn, B., Sagen, I. M., Øyane, N., Waage, S., Fetveit, A., Pallesen, S., Ursin, R. (2007). The association between sleep duration, body mass index and metabolic measures in the Hordaland Health Study. *Journal of Sleep Research*. 16: 66-76
- Borbély, A. A. (1982). A two process model of sleep regulation. *Human Neurobiology*. 3: 195-204

- Buhr, E. D., Yoo, S. H., Takahashi, J. S. (2010). Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science*. 330: 379-385
- Buyse, D. J., Reynolds, C. F., Monk, T. H., Berman, S. R., Kupfer, D. J., (1989). The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Research*. 28: 193-213
- Campbell, S. S., Murphy, P. J. (2007). Delayed sleep phase disorder in temporal isolation. *Sleep*. 30: 1225-1228
- Ciarleglio, C. M., Ryckman, K., Servick, S. V., Hilda, A., Robbins, S., Wells, N., Hicks, J., Larson, S. A., Wiedermann, J. P., Carver, K., Hamilton, N., Kidd, J. R., Smith, J. R., Friedlaender, J., McMahon, D. G., Williams, S., Summar, M. L., Johnson, C. H. (2008). Genetic Differences in Human Circadian Clock Genes Among Worldwide Populations. *Journal of Biological Rhythms*. 23: 330-340
- Dijk, D.-J., Archer, S. N. (2010). *PERIOD3*, circadian phenotypes, and sleep homeostasis. *Sleep Medicine Reviews*. 14: 151-160
- Dijk, D.-J., Duffy, J. F., Silva, E. J., Shanahan, T. L., Boivin, D. B., Czeisler, C. A. (2012). Amplitude Reduction and Phase Shifts of Melatonin, Cortisol and Other Circadian Rhythms after a Gradual Advance of Sleep and Light Exposure in Humans. *PLoS ONE*. 7: e30037
- Duffy, J. F., Dijk, D.-J. (2002). Getting Through to Circadian Oscillators: Why Use Constant Routines? *Journal of Biological Rhythms*. 17: 4-13
- Dunlap, J. C. (1999). Molecular basis for circadian clocks. *Cell*. 96: 217-290
- Ebisawa, T., Uchiyama, M., Kajimura, N., Mishima, K., Kamei, Y., Katoh, M., Watanabe, T., Sekimoto, M., Shibui, K., Kim, K., Kudo, Y., Ozeki, Y., Sugishita, M., Toyoshima, R., Inoue, Y., Yamada, N., Nagase, T., Ozaki, N., Ohara, O., Ishida, N., Okawa, M., Takahashi, K., Yamauchi, T. (2001). Association of structural polymorphism in the human *period3* gene with delayed sleep phase syndrome. *EMBO reports*. 2: 342-346
- Ellis, J., von Schantz, M., Jones, K. H., Archer, S. N. (2009). Association between specific diurnal preference questionnaire items and PER3 VNTR genotype. *Chronobiology International*. 26: 464-473
- Field, M. D., Maywood, E. S., O'Brien, J. A., Weaver, D. R., Reppert, S. M., Hastings, M. H. (2000). Analysis of clock proteins in mouse SCN demonstrates phylogenetic divergence of the circadian clockwork and resetting mechanisms. *Neuron*. 25: 437-447
- Foster, R. G., Hankins, M. W. (2007). Circadian vision. *Current Biology*. 17: R746-R751
- Fu, L., Lee, C. C. (2003). The circadian clock: pacemaker and tumor suppressor. *Nature Reviews Cancer*. 3: 350-361
- Greer, W., Sandridge, A. L., Chehabeddine, R. S. (2003). The frequency distribution of age at natural menopause among Saudi Arabian women. *Maturitas*. 43: 263-272
- Groeger, J. A., Viola, A. U., Lo, J. C. Y., von Schantz, M., Archer, S. N., Dijk, D.-J. (2008). Early Morning Executive Functioning During Sleep Deprivation Is Compromised by a *PERIOD3* Polymorphism. *Sleep*. 31: 1159-1167

- Gulec, M., Selvi, Y., Boysan, M., Aydin, A., Oral, E., Aydin, E. F. (2013). Chronotype effects on general well-being and psychopathology levels in healthy young adults. *Biological Rhythm Research*. 44: 457-468
- Hansen, V. M., Madsen, M. T., Hageman, I., Rasmussen, L. S., Bokmand, S., Rosenberg, J., Gögenur, I. (2012). The effect of MELAtOnin on Depression, anxiety, cognitive function and sleep disturbances in patients with breast cancer. The MELODY trial: protocol for a randomised, placebo-controlled, double-blinded trial. *BMJ Open*. 2: e000647
- Horne, J. A., Östberg, O. (1976). A self- assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *International Journal of Chronobiology*. 4: 97-110
- Jenkins, A., Archer, S. N., von Schantz, M. (2005). Expansion during primate radiation of a variable number tandem repeat in the coding region of the circadian clock gene *period3*. *Journal of Biological Rhythms*. 20: 470-472
- Jones, C. R., Campbell, S. S., Zane, S. E., Cooper, F., DeSano, A., Murphy, P. J., Jones, B., Czajkowski, L., Ptáček, L. J. (1999). Familial advanced sleep phase syndrome. *Nature Medicine*. 5: 1089-1094
- Jones, K. H. S., Ellis, J., von Schantz, M., Skene, D. J., Dijk, D.-J., Archer, S. N. (2007). Age-related change in the association between a polymorphism in the *PER3* gene and preferred timing of sleep and waking activities. *Journal of Sleep Research*. 16: 12-16
- Kang, S. G., Choi, T. Y., Choi, J. E., Yoon, H. K., Park, Y. M., Kim, S. J., Kripke, D. F., Kim, L., Lee, H. J. (2011). *PER3* gene variation is not associated with diurnal preference in a Korean young population. *Neuropsychopharmacology*. 21: S244
- Ko, C. H., Takahashi, J. S. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics*. 15: R271-R277
- Koskenvuo, M., Hublin, C., Partinen, M., Heikkilä, K., Kaprio, J. (2007). Heritability of diurnal type: a nationwide study of 8753 adult twin pairs. *Journal of Sleep Research*. 16: 156-162
- Kunorozva, L., Stephenson, K. J., Rae, D. E., Roden, L. C. (2012). Chronotype and *PERIOD3* Variable Number Tandem Repeat Polymorphism in Individual Sports Athletes. *Chronobiology International*. 29: 1004-1010
- Lack, L., Bailey, M., Lovato, N., Wright, H. (2009). Chronotype differences in circadian rhythms of temperature, melatonin, and sleepiness as measured in a modified constant routine protocol. *Nature and Science of Sleep*. 1: 1-8
- Lázár, A. S., Slak, A., Lo, J. C.-Y., Santhi, N., von Schantz, M., Archer, S. N., Groeger, J. A., Dijk, D.-J. (2012). Sleep, Diurnal Preference, Health, and Psychological Well-being: A Prospective Single-Allelic-Variation Study. *Chronobiology International*. 29: 131-146
- Lázár, A. S., Santhi, N., Hasan, S., Lo, J. C.-Y., Johnston, J., von Schantz, M., Archer, S. N., Dijk, D.-J. (2013). Circadian period and the timing of melatonin onset in men and women: predictors of sleep during the weekend and in the laboratory. *Journal of Sleep Research*. 22: 155-159
- Lee, H.-J., Kim, L., Kang, S.-G., Yoon, H.-K., Choi, J.-E., Park, Y.-M., Kim, S. J., Kripke, D. F. (2011). *PER2* Variation in Associated with Diurnal Preference in a Korean Young Population. *Behavior Genetics*. 41: 273-277

- Lipkova, J., Bienertova-Vasku, J. A., Spinarova, L., Bienert, P., Hlavna, M., Pavkova Goldbergova, M., Parenica, J., Spinar, J., Vasku, A. (2012). *Per3 VNTR polymorphism and chronic heart failure*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub
- Liu, Z., Chu, G. (2013). Chronobiology in mammalian health. *Molecular Biology Report*. 40: 2491-2501
- Marcheva, B., Ramsey, K. M., Buhr, E. D., Kobayashi, Y., Su, H., Ko, C. H., Ivanova, G., Omura, C., Mo, S., Vitaterna, M. H., Lopez, J. P., Philipson, L. H., Bradfield, C. A., Crosby, S. D., JeBailey, L., Wang, X., Takahashi, J. S., Bass, J. (2010). Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature*. 466: 627-631
- Merikanto, I., Kronholm, E., Peltonen, M., Laatikainen, T., Lahti, T., Partonen, T. (2012). Relation of Chronotype to Sleep Complaints in the General Finnish Population. *Chronobiology International*. 29: 311-317
- Merikanto, I., Lahti, T., Puolijoki, H., Vanhala, M., Peltonen, M., Laatikainen, T., Vartiainen, E., Salomaa, V., Kronholm, E., Partonen, T. (2013). Association of Chronotype and Sleep With Cardiovascular Diseases and Type 2 Diabetes. *Chronobiology International*. 4: 470-477
- Mohawk, J. A., Green, C. B., Takahashi, J. S. (2012). Central and Peripheral Circadian Clocks in Mammals. *The Annual Review of Neuroscience*. 35: 445-462
- Mongrain, V., Carrier, J., Dumont, M. (2006a). Difference in sleep regulation between morning and evening types as indexed by antero-posterior analyses of the sleep EEG. *European Journal of Neuroscience*. 23: 497-504
- Mongrain, V., Carrier, J., Dumont, M. (2006b). Circadian and homeostatic sleep regulation in morningness-eveningness. *Journal of Sleep Research*. 15: 162-166
- Muro, A., Gomá-i-Freixanet, M., Adan, A. (2009). Morningness-eveningness, sex, and the alternative five factor model of personality. *Chronobiology International*. 26: 1235-1248
- Nadkarni, N. A., Weale, M. E., von Schantz, M., Thomas, M. G. (2005). Evolution of a Length Polymorphism in the Human *PER3* Gene, a Component of the Circadian System. *Journal of Biological Rhythms*. 20: 490-499
- Nováková, M., Sládek, M., Sumová, A. (2013). Human Chronotype Is determined in Bodily Cells Under Real-Life Conditions. *Chronobiology International*. 30: 607-617
- Ogińska, H. (2011). Can you feel the rhythm? A short questionnaire to describe two dimensions of chronotype. *Personality and Individual Differences*. 50: 1039-1043
- Osland, T. M., Bjorvatn, B., Steen, V. M., Pallesen, S. (2011). Association Study of Variable-Number Tandem Repeat Polymorphism in the Clock Gene *PERIOD3* and Chronotype in Norwegian University Students. *Chronobiology International*. 28: 764-770
- Paine, S.-J., Gander, P. H., Travier, N. (2006). The Epidemiology of Morningness/Eveningness: Influence of Age, Gender, Ethnicity, and Socioeconomic Factors in Adults. *Journal of Biological Rhythms*. 21: 68-76
- Park, Y. M., Matsumoto, K., Seo, Y. J., Kang, M. J., Nagashima, H. (2002). Changes of sleep or waking habits by age and sex in Japanese. *Perceptual and Motor Skills*. 94: 1199-1213

- Pereira D. S., Tufik, S., Louzada, F. M., Benedito-Silva, A. A., Lopez, A. R., Lemos, N. A., Korczak, A. L., D'Almeida, V., Pedrazzoli, M. (2005). Association of the Length Polymorphism in the Human Per3 Gene with the Delayed Sleep-Phase Syndrome: Does Latitude Have an Influence Upon It? *Sleep*. 28: 29-32
- Refinetti, R. (2010). Entrainment of circadian rhythm by ambient temperature cycles in mice. *Journal of Biological Rhythms*. 25: 247-256
- Reinberg, A., Ashkenazi, I. (2003). Concept in human biological rhythms. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 5: 327-342
- Roenneberg, T., Wirz-Justice, A. and Mellow, M. (2003). Life between Clocks: Daily Temporal Patterns of Human Chronotypes. *Journal of Biological Rhythms*. 18: 80-90
- Roenneberg, T., Kuehnle, T., Pramstaller, P. P., Ricken, J., Havel, M., Guth, A., Mellow, M. (2004). A marker for the end of adolescence. *Current Biology*. 14: R1038-1039
- Roenneberg, T., Mellow, M. (2005). Circadian clocks – the fall and rise of physiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 6: 965-971
- Roenneberg, T., Kuehnle, T., Juda, M., Kantermann, T., Allebrandt, K. V., Gordijn, M., Mellow, M. (2007a). Epidemiology of the human circadian clock. *Sleep Medicine Reviews*. 11: 429-438
- Roenneberg, T., Kumar, C. J., Mellow, M. (2007b). The human circadian clock entrains to sun time. *Current Biology*. 17: R44-R45
- Roenneberg, T., Allebrandt, K. V., Mellow, M., Vetter, C. (2012). Social Jetlag and Obesity. *Current Biology*. 22: 939-943
- Sack, R. L., Auckley, D., Auger, R. R., Carskadon, M. A., Wright, K. P. Jr., Vitiello, M. V., Zhdanova, I. V. (2007). Circadian rhythm sleep disorders: part II, advanced sleep phase disorder, delayed sleep phase disorder, free-running disorder, and irregular sleep-wake rhythm. *An American Academy of Sleep Medicine reviews. Sleep*. 30: 1484-1501
- Santhi, N., Thorne, H. C., van der Veen, D. R., Johnsen, S., Mills, S. L., Hommes, V., Schlangen, L. J., Archer, S. N., Dijk, D. J. (2012). The spectral composition of evening light and individual differences in the suppression of melatonin and delay of sleep in humans. *Journal of Pineal Research*. 53: 47-59
- Sato, T. K., Panda, S., Miraglia, L. J., Reyes, T. M., Rudic, R. D., McNamara, P., Naik, K. A., FitzGerald, G. A., Kay, S. A., Hogenesch, J. B. (2004). A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*. 43: 527-537
- Schibler, U., Sassone-Corsi, P. (2002). A Web of Circadian Pacemakers. *Cell*. 111: 919-922
- Schneider, M. L. De M., Vasconcellos, D. C., Dantas, G., Levandovski, R., Caumo, W., Allebrandt, K. V., Doring, M., Hidalgo, M. P. L. (2011). Morningness-eveningness, use of stimulants, and minor psychiatric disorders among undergraduate students. *International Journal of Psychology*. 46: 18-23
- Soehner, A. M., Kennedy, K. S., Monk, T. H. (2011). Circadian Preference and Sleep-Wake Regularity: Associations With Self-Report Sleep Parameters in Daytime-Working Adults. *Chronobiology International*. 28: 802-809

- Steinmeyer, C., Mueller, J. C., Kempenaers, B. (2009). Search for informative polymorphisms in candidate genes: Clock genes and circadian behavior in blue tits. *Genetica*. 136: 109-117
- Zavada, A., Gordijn, M. C. M., Beersma, D. G. M., Daan, S., Roenneberg, T. (2005). Comparison of the Munich Chronotype Questionnaire with the Horne- Östberg's morningness-eveningness score. *Chronobiology International*. 22: 267-278
- Zhu, Y., Brown, H. N., Zhang, Y., Stevens, R. G., Zheng, T. (2005). Period3 structural variation: a circadian biomarker associated with breast cancer in young women. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 14: 268-270
- Takahashi, J. S., Hong, H. K., Ko, C. H., McDearmon, E. L. (2008). The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet*. 9: 764-775
- Toh, K. L. (2008). Basic Science Review on Circadian Rhythm Biology and Circadian Sleep Disorders. *Annals Academy of Medicine Singapore*. 37: 662-668
- Viola, A. U., Archer, s. N., James, L. M., Groeger, J. A., Lo, J. C. Y., Skene, D. J., von Schantz, M., Dijk, D.-J. (2007). *PER3* Polymorphism Predictes Sleep Structure and Waking Performance. *Current Biology*. 17: 613-618
- Viola, A. U., Chellappa, S. L., Archer, S. N., Pugin, F., Götz, T., Dijk, D.-J., Cajochen, C. (2012). Interindividual differences in circadian rhythmicity and sleep homeostasis in older people: effect of a *PER3* polymorphism. *Neurobiology of Aging*. 33: 1010.e17-1010.e27
- Vitaterna, M. H., Takahashi, J. S., Turek, F. W. (2001). Overview of circadian rhythms. *Alcohol Research & Health*. 25: 85-93
- Welsh, D. K., Yoo, S. H., Liu, A. C., Takahashi, J. S., Kay, S. A. (2004). Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. *Current Biology*. 14: 2289-2295
- Welsh, D. K., Takahashi, J. S., Kay, S. A. (2010). Suprachiasmatic Nucleus: Cell Autonomy and Network Properties. *Annual Review of Physiology*. 72: 551-577
- Wittmann, M., Dinich, J., Mellow, M., Roenneberg, T. (2006). Social jetlag: misalignment of biological and social time. *Chronobiology International*. 23: 497-509
- Wittmann, M., Paulus, M., Roenneberg, T. (2010). Decreased Psychological Well-Being in Late 'Chronotypes' Is Mediated by Smoking and Alcohol Consumption. *Informa Healthcare, Substance Use & Misuse*. 45: 15-30
- Wyatt, J. K., Ritz-De Cecco, A., Czeisler, C. A., Dijk, D. J. (1999). Circadian temperature and melatonin rhythms, sleep, and neurobehavioral function in humans living on a 20-h day. *American Journal of Physiology*.

B) Raamat

- Arendt, J. 1995. Melatonin and the pineal gland. London: Chapman hall
- Roenneberg, T. 2012. Internal Time. Harvard University Press

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<http://www.iisc.ernet.in/currsci/dec25/articles38.htm>

<http://drcatherinedarley.wordpress.com/2009/11/23/your-cortisol-rhythm-and-sleep/>

<http://www.medilexicon.com/medicaldictionary.php?t=17540>

<http://www.cet-hosting.com/limesurvey/index.php?sid=61524&lang=en>

https://www.bioinfo.mpg.de/mctq/core_work_life/core/core.jsp?language=eng

<http://www.sleep.pitt.edu/includes/showFile.asp?fltype=doc&fIID=2532>

http://www.nhlbi.nih.gov/health/public/heart/obesity/lose_wt/risk.htm#limitations

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5187>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8864>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8863>

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000049246;r=1:7844380-7905237;t=ENST00000377532

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?LinkName=gene_pubmed&from_uid=8863

LISAD

Lisa 1. Valemid uneparametrite arvutamiseks Microsoft Office Excel tarkvaraprogrammis

SO_w- une algusaeg tööpäevadel

=IF(OR(MAGAMA SÄTTIMISE KELLAAEG TÖÖPÄEVADEL="";UINUMISEKS KULUNUD MINUTID TÖÖPÄEVADEL="");"";IF(((MINUTE(MAGAMA SÄTTIMISE KELLAAEG TÖÖPÄEVADEL)+UINUMISEKS KULUNUD MINUTID TÖÖPÄEVADEL)/60+HOUR(MAGAMA SÄTTIMISE KELLAAEG TÖÖPÄEVADEL))>12;((MINUTE(MAGAMA SÄTTIMISE KELLAAEG TÖÖPÄEVADEL)+UINUMISEKS KULUNUD MINUTID TÖÖPÄEVADEL)/60+HOUR(MAGAMA SÄTTIMISE KELLAAEG TÖÖPÄEVADEL))-24;((MINUTE(MAGAMA SÄTTIMISE KELLAAEG TÖÖPÄEVADEL)+UINUMISEKS KULUNUD MINUTID TÖÖPÄEVADEL)/60+HOUR(MAGAMA SÄTTIMISE KELLAAEG TÖÖPÄEVADEL))))

SE_w- ärkamise aeg tööpäevadel

=IF(SE_w hh:mm ="";"";HOUR(SE_w hh:mm)+MINUTE(SE_w hh:mm)/60)

SD_w- une kestus tööpäevadel

=IF(OR(SE_w="";SO_w="");"";SE_w-SO_w)

SO_f- une algusaeg puhkepäevadel

=IF(OR(MAGAMA SÄTTIMISE KELLAAEG PUHKEPÄEVADEL="";UINUMISEKS KULUNUD MINUTID PUHKEPÄEVADEL="");"";IF(((MINUTE(MAGAMA SÄTTIMISE KELLAAEG PUHKEPÄEVADEL)+UINUMISEKS KULUNUD MINUTID PUHKEPÄEVADEL)/60+HOUR(MAGAMA SÄTTIMISE KELLAAEG PUHKEPÄEVADEL))>12;((MINUTE(MAGAMA SÄTTIMISE KELLAAEG PUHKEPÄEVADEL)+UINUMISEKS KULUNUD MINUTID PUHKEPÄEVADEL)/60+HOUR(MAGAMA SÄTTIMISE KELLAAEG PUHKEPÄEVADEL))-24;((MINUTE(MAGAMA SÄTTIMISE KELLAAEG PUHKEPÄEVADEL)+UINUMISEKS KULUNUD MINUTID PUHKEPÄEVADEL)/60+HOUR(MAGAMA SÄTTIMISE KELLAAEG PUHKEPÄEVADEL))))

SE_f- ärkamise aeg puhkepäevadel

=IF(SE_f hh:mm="";"";HOUR(SE_f hh:mm)+MINUTE(SE_f hh:mm)/60)

SD_f- une kestus puhkepäevadel

=IF(OR(SE_f="";SO_f="");"";SE_f-SO_f)

AvSD- keskmine une kestus (eeldusel, et tööpäevi on nädalas 5 ja puhkepäevi 2)

=IF(OR(SD_w="";SD_f="");"";(5*SD_w+2*SD_f)/7)

MSW- une keskaeg tööpäevadel

=IF(OR(SD_w="";SO_w="");"";SO_w+SD_w/2)

MSF- une keskaeg puhkepäevadel

=IF(OR(SD_f="";SO_f="");"";SO_f+SD_f/2)

MSF_sc- unevõla suhtes korrigeeritud une keskaeg puhkepäevadel

=IF(OR(MSF="";SD_f="";AvSD="");"";MSF-(SD_f-AvSD)/2)

MSF_sasc- unevõla, soo ja vanuse suhtes korrigeeritud une keskaeg puhkepäevadel

=IF(OR(SUGU="";VANUS="";MSF_SC="");"";IF(NOT(OR((SUGU="N");(SUGU="M")));
4,4773482+(MSF_SC-(IF(VANUS<20;-0,70564+0,48648*VANUS-
0,0098864*VANUS^2;3,5422*(((VANUS-5,5844)/-38,392)/SQRT(1+((VANUS-5,5844)/-
38,392)^2))+6,3782)));IF(SUGU="N";4,4773482+(MSF_SC-(IF(VANUS<20;-
0,17136+0,43229*VANUS-0,0090152* VANUS^2;73,716*(((VANUS+32,128)/-
12,294)/SQRT(1+((VANUS+32,128)/-12,294)^2))+76,576)));4,4773482+(MSF_SC-
(IF(VANUS<22;-1,6392+0,58632*VANUS-0,011876*VANUS^2;3,0288*(((VANUS-
16,382)/-30,966)/SQRT(1+((VANUS-16,382)/-30,966)^2))+5,9414))))))

ΔMS-„sotsiaalne“ võõndivahetusväsimum

=ABS(MSF-MSW)

Lisa 2. Publitseeritud uuringud, kus on kellageenides esinevaid polümorfisme seostatud tsirkadiaanse fenotüübiga (Steinmeyer jt., 2009, kohandatud)

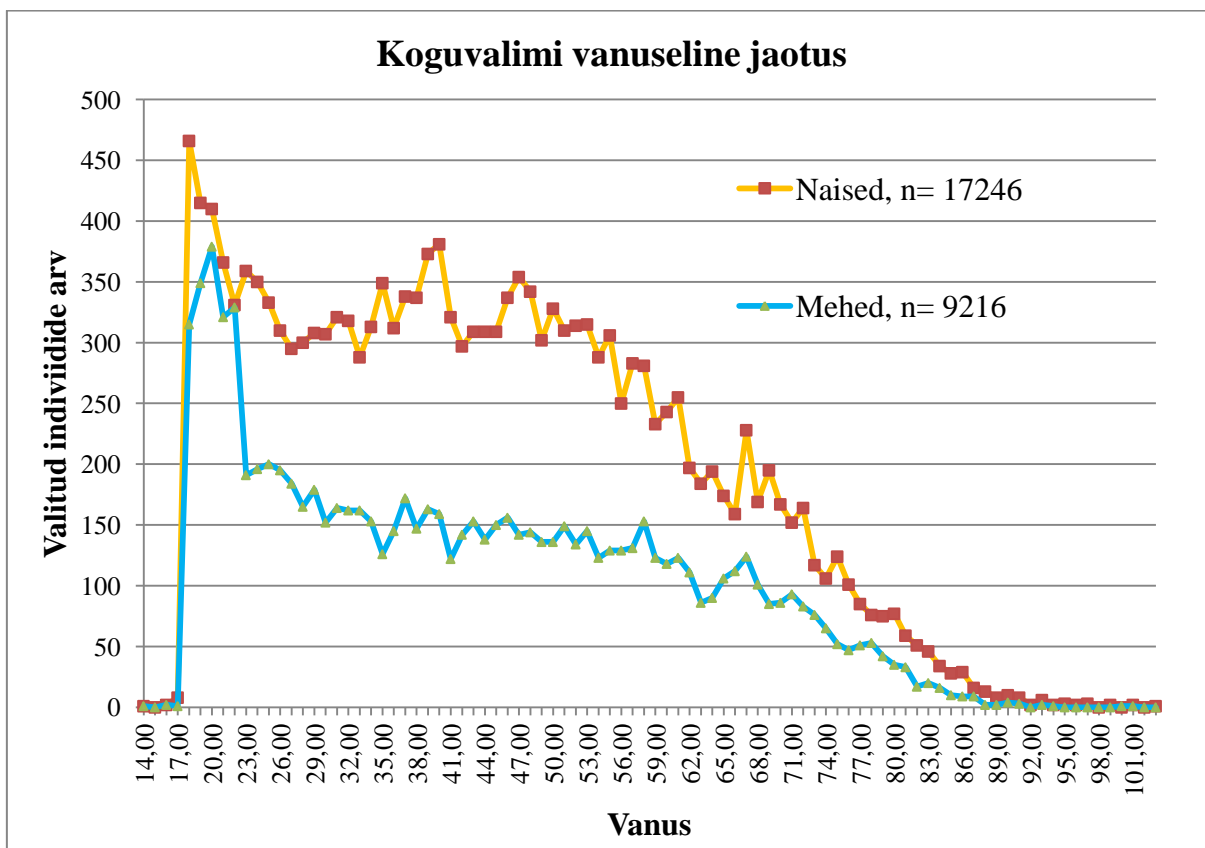
Geen	Liik	Regioon	Polümorfismi originaalnimi ^a	Aminohappe vahetus	Fenotüüp	Seose esinemine	Publikatsioonid
CLOCK	Inimene	Ekson 17	A1982G	Jah	DSPS ja N-24	Ei	Iwase jt.. (2002)
		Ekson 17	G1955A	Jah	DSPS ja N-24	Ei	Iwase jt.. (2002)
					Hommik-õhtu eelistus	Jah	Mishima jt.. (2005)
					Hommik-õhtu eelistus	Jah	Katzenberg jt.. (1998)
					Hommik-õhtu eelistus, DSPS	Ei	Robilliard jt.. (2002)
					DSPS ja N-24	Ei	Iwase jt.. (2002)
					Hommik-õhtu eelistus, DSPS	Ei	Pedrazzoli jt.. (2007)
		3' UTR	T3111C	Ei			
		5' UTR	T257G	Ei	Hommik-õhtu eelistus, DSPS	Ei	Pedrazzoli jt.. (2007)
PERIOD1	Inimene	Ekson 18	T2434C	Ei	Hommik-õhtu eelistus	Jah	Carpen jt.. (2006)
		Ekson 18	A2548G	Ei	Hommik-õhtu eelistus	Ei	Katzenberg jt.. (1999)
PERIOD2	Inimene	Ekson 17	A2106G	Jah	ASPS	Jah	Toh jt.. (2001)
		Promootor	C-1228T	Ei	Hommik-õhtu eelistus	Ei	Carpen jt.. (2005)
		5' UTR	C111G	Ei	Hommik-õhtu eelistus	Jah	Carpen jt.. (2005)
		Ekson 23	G3853A	Jah	Hommik-õhtu eelistus	Ei	Carpen jt.. (2005)
PERIOD3	Inimene	Ekson 15, 17, 18, 20	T1940G, C2590G, T3110C, A3473A, del(3031-3084nt)	Jah	DSPS (haplotüübi analüüs üle kõigi viie lookuse)	Jah	Ebisawa jt.. (2001)
		Ekson 18	Viie või nelja kordusega VNTR		Hommik-õhtu eelistus	Jah	Jones jt.. (2007)
			del(3031-3084nt)		Hommik-õhtu eelistus, DSPS	Jah	Archer jt.. (2003)
		Ekson 15	T1940G	Jah	Hommik-õhtu eelistus	Jah	Johansson jt.. (2003)
AAAT	Inimene	Promootor	T-542G	Ei	Une homöostaas	Ei	Wang jt.. (2004)
					Une homöostaas	Jah	Wang jt.. (2004)
		Promootor	G-263C	Ei	DSPS	Ei	Hohjoh jt.. (2003)
		Ekson 4	C702T	Ei	DSPS	Ei	Hohjoh jt.. (2003)
		Ekson 4	C756T	Ei	DSPS	Ei	Hohjoh jt.. (2003)
		Ekson 4	G619A	Jah	DSPS	Jah	Hohjoh jt.. (2003)
CKIδ	Inimene	Ekson 2	T44A ^b	Jah	FASPS	Jah	Xu jt.. (2005)
CKIε	Inimene	Ekson 9	G1223A	Jah	DSPS ja N-24	Jah	Takano jt.. (2004)
MTNRIa	Inimene	Ekson 1	C160T	Jah	DSPS ja N-24	Ei	Ebisawa jt.. (1999)
		Ekson 2	C470T	Jah	DSPS ja N-24	Ei	Ebisawa jt.. (1999)
MTNRIb	Inimene	Ekson 1	G71A	Jah	DSPS ja N-24	Ei	Ebisawa jt.. (2000)
		Ekson 1	C196T	Jah	DSPS ja N-24	Ei	Ebisawa jt.. (2000)
PRNP	Inimene	Ekson 2	D178N ^b	Jah	Fataalne perekondlik unetus	Jah	Tafti jt.. (2005)
TIMELESS	Inimene	Ekson 20	A2634G	Jah	Hommik-õhtu eelistus	Ei	Pedrazzoli jt.. (2000)
HLA DRI	Inimene				DSPS	Ei	Hohjoh jt.. (1999)

DSPS, hilinenud une sündroom; (F)ASPS, (Perekondlik) varajase une sündroom; N-24, ebaregulaarne une-ärkveloleku tsükkel; SNP, ühenukleotiidne polümorfism, VNTR, varieeruva arvuga tandemkordus

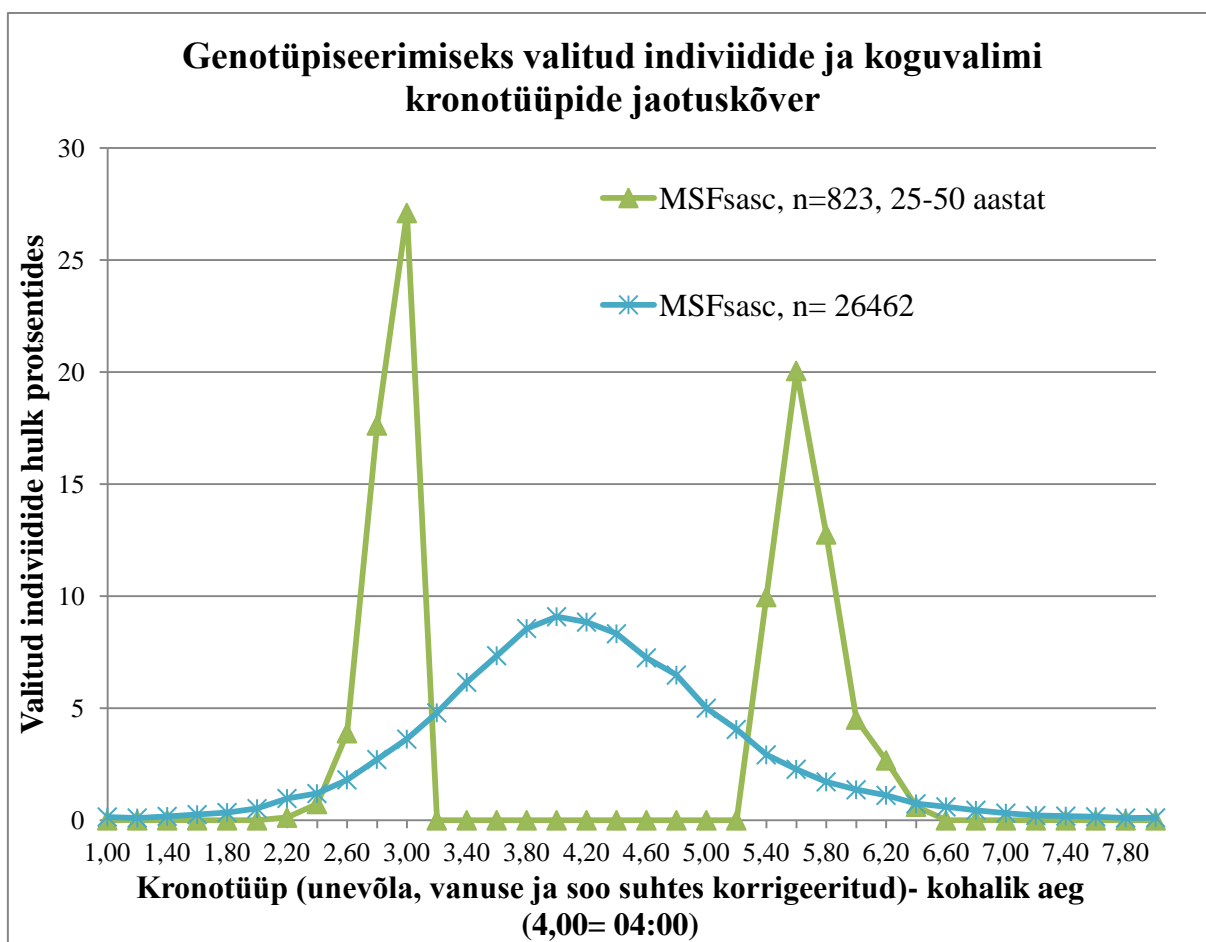
^a Viitab nukleotiidsele asendusele või nukleotiidi positsioonile

^b Aminohappe muutus koos positsiooniga valgus

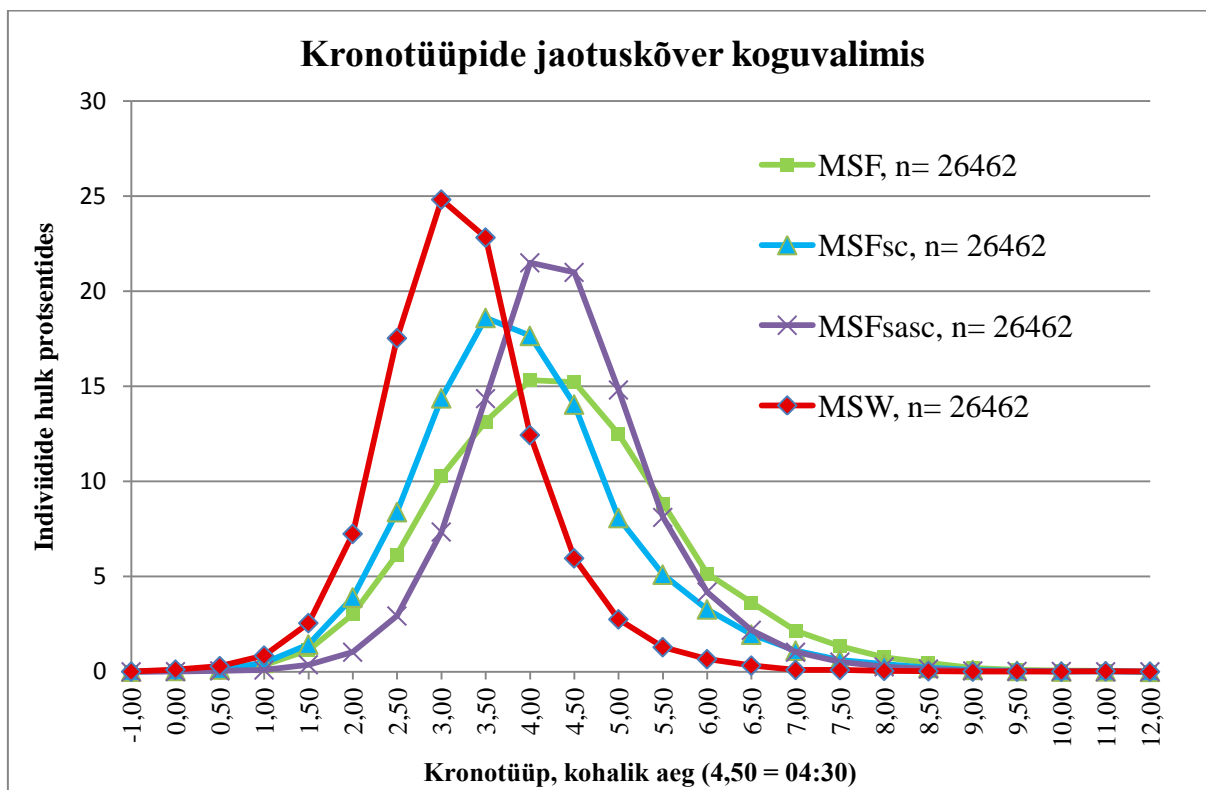
Lisa 3. Koguvalimi (n = 26 462) soolist ja vanuselist jaotust peegeldav graafik



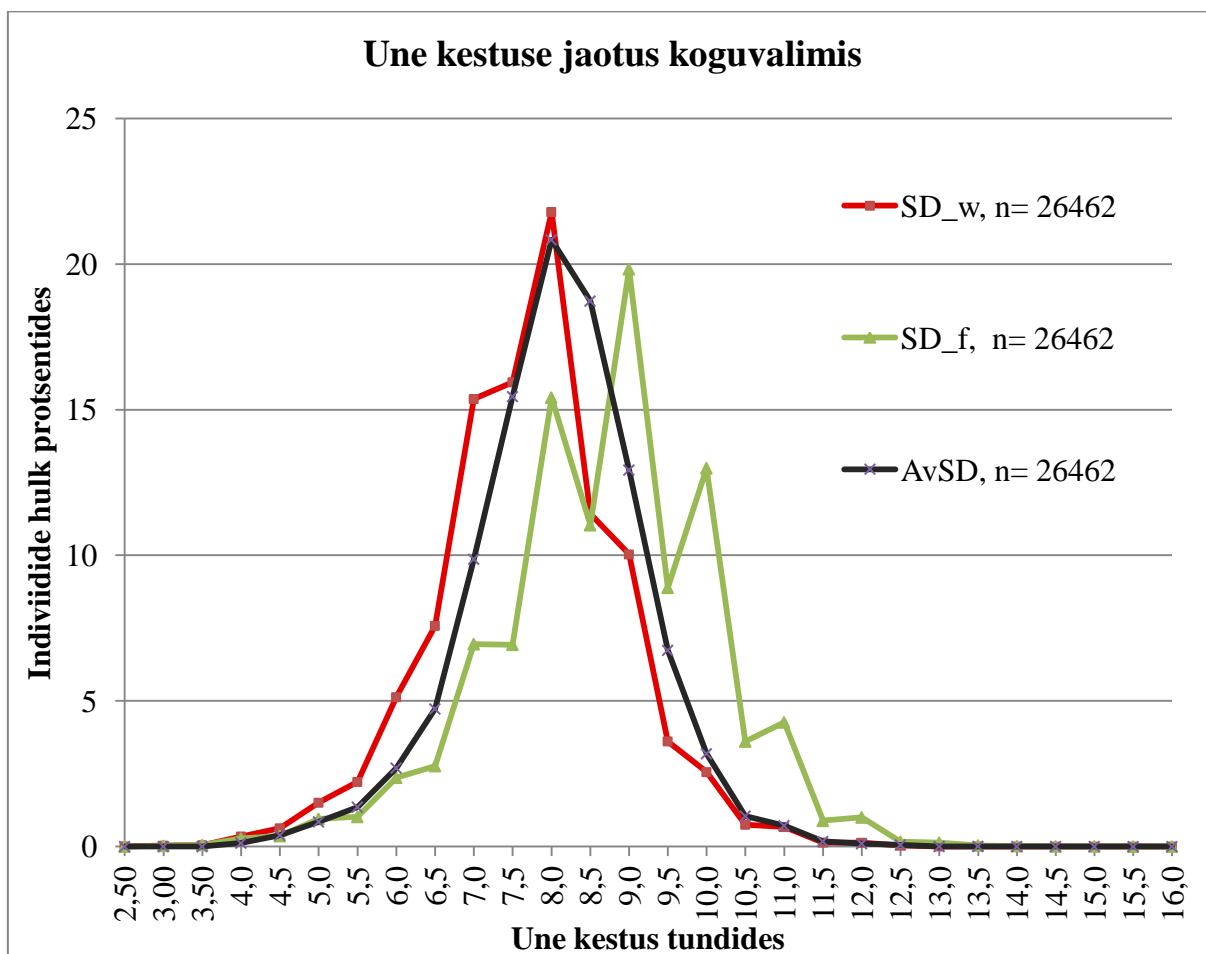
Lisa 4. *Per3* polümorfismi genotüüpiseerimiseks soo vanuse ja unevõla suhtes korrigeeritud une keskaja (MSFsasc) alusel valitud valimi (n = 823) ja koguvalimi (n = 26 462) jaotuskõverad. *Per3* genotüüpiseerimise valimis on ainult eestlased vanuses 25 kuni 50 aastat.



Lisa 5. Kronotüüpide jaotusi koguvalimis (n = 26 462) kujutavad graafikud.



Lisa 6. Une kestusi töö- ja puhkepäevadel ja keskmist une kestust koguvalimis (n = 26 462) kujutavad graafikud



Lisa 7. *Per3* VNTR (rs57875989) genotüpiseerimise valimi ja noortest doonoritest koosneva osavalimi (uneandmed vööndiajal) genotüüpide ja alleelide sagedused varajases ja hilises kronotüübiklassis

Valim	25–50, n = 822				25–35, n = 191, vööndiaeg			
	<i>Per3</i> 4/4	<i>Per3</i> 4/5	<i>Per3</i> 5/5	<i>Per3</i> ⁴ alleeli- sagedus	<i>Per3</i> 4/4	<i>Per3</i> 4/5	<i>Per3</i> 5/5	<i>Per3</i> ⁴ alleeli- sagedus
Varajane (MSFsasc < 2,99)	187 (46%)	179 (44%)	40 (10%)	0,68	43 (47%)	36 (40%)	12 (13%)	0,67
Hiline (MSFsasc > 5,32)	166 (40%)	200 (48%)	50 (12%)	0,64	41 (41%)	48 (48%)	11 (11%)	0,65

LIHTLITSENTS

Mina, Jaanika Moro

(sünnikuupäev: 31. 05. 1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Une- ja ärkveloleku tsükli analüüs TÜ Eesti Geenivaramu doonoritel

Per3 geeni varieeruva arvuga tandemkorduse rs57875989 mõju uneparameetritele,

mille juhendaja on Maris Teder-Laving,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28. 05. 2013